

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Efecto diurético del zumo del fruto del limón (Citrus
limón L.) en ratas de experimentación**

TESIS

para optar al grado académico de Magíster en Farmacología con Mención
en Farmacología Experimental

AUTOR

José Alfonso Apesteguía Infantes

ASESORES

Jorge Arroyo Acevedo

Manuel Palomino Yamamoto

Lima-Perú

2009

**Dedico el presente trabajo a mi Esposa e
Hijos : Madalit, Rodrigo, Valeria ; A mis
Hermanos : Rosa, Johnny, Chabela ; A
mi sobrino : André y A mis Padres : Don
Alfonso y Doña Rosa (+)
por haberme apoyado toda mi vida ,
brindándome todo el cariño y atención
debidos.**

**A mis Asesores : Dr. Jorge Arroyo Acevedo y
Dr. Manuel Palomino Yamamoto, por sus
sabios consejos y diligente dirección de tesis.**

**Al Dr. José E. Betancourt Badel (+) por
sus enseñanzas, apoyo y colaboración
desinteresada a este trabajo de tesis.**

Mi eterno agradecimiento a los Miembros del Jurado Examinador y Calificador :

Dra. Eloisa Hernández Fernández (Presidente)

Dr. José Ernesto Raéz Gonzáles (Miembro)

Dra. Elizabeth Gonzáles Loayza (Miembro)

Mg. Arilmi Gorriti Gutiérrez (Miembro)

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (Miembro)

Por su justa y pertinente labor en la asesoría y evaluación del presente trabajo de investigación .

ÍNDICE

	PAGINA
I.A. RESUMEN	5
I.B. SUMMARY	6
II. INTRODUCCIÓN	7
III. GENERALIDADES.....	8
3.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA RENALES.....	8
3.2. ANATOMÍA FISIOLÓGICA DE LA VEJIGA	8
3.3. DIURÉTICOS.....	10
3.4. CLASIFICACIÓN DE DROGAS DIURÉTICAS	11
3.5. HIPERTENSIÓN ARTERIAL	15
3.6. EDEMA.	19
3.7. ASPECTOS BOTÁNICOS DEL <i>Citrus limon</i> L.	21
IV. PARTE EXPERIMENTAL.	29
4.1. ESTUDIO FARMACOLÓGICO.....	29
4.2. ESTUDIO TOXICOLÓGICO	38
4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
V. RESULTADOS	42
5.1. ESTUDIO FARMACOLÓGICO	42
5.2. ESTUDIO TOXICOLÓGICO	69
VI. DISCUSION	74
6.1. ESTUDIO FARMACOLÓGICO	74
6.2. ESTUDIO TOXICOLÓGICO	78
VII. CONCLUSIONES.	80
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
IX. ANEXOS	86

I.A . RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por objetivo principal : demostrar el efecto diurético y comprobar la seguridad del zumo del fruto del limón (*Citrus limon L.*) . Para evaluar la diuresis producida por el zumo del fruto del limón según el método de Naiv. V., R. et al (1981) con modificaciones, se liofilizó el zumo del fruto y se administró a ratas albinas hembras de Cepa Holtzman en dosis de 180 mg/Kg, 540 mg/Kg y 900 mg/Kg de de peso corporal en un volumen de 25mL/Kg , comparados a un control negativo y 2 fármacos diuréticos de referencia , para luego recolectar el volumen urinario a razón de 30 , 60, 90, 180, 270 y 360 minutos y medir el pH y electrolitos urinarios. Para determinar la seguridad se utilizó el método de las clases toxicas agudas correspondiente a la guía para los Ensayos de Sustancias Químicas N° 423 de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD) . Se encontró que el pH, electrolitos y volúmenes urinarios del zumo liofilizado difirieron significativamente de los del control negativo y los 2 fármacos de referencia. Se obtuvo asimismo que el zumo del fruto del limón posee una DL50 de 5,000 mg/Kg de peso corporal . Con la aplicación del zumo liofilizado y los fármacos en el biomodelo experimental, se concluye que el zumo del fruto del limón producen un efecto de incremento del pH, electrolitos y volúmenes urinarios y que es seguro de administrar hasta una dosis de 5,000 mg/Kg en una sola toma en 24 horas .

Palabras Clave : Diuresis, *Citrus limon L.*, Saluresis , Furosemida, Hidroclorotiazida, OECD .

I.B. SUMMARY

The present research had as main objective : demonstrate the diuretic effect and check the safety of the juice from the fruit of the lemon (*Citrus limon L.*). To evaluate the urine output produced by the fruit of the lemon juice depending on Naiv V., R. et al (1981) method with modifications, the fruit juice was freeze-dried and administered to female albino rats of Holtzman strain at doses of 180 mg/kg, 540 mg/kg and 900 mg/kg of body weight on a volume of 25mL/Kg, compared to a negative control and 2 reference diuretic drugs, and then collected the urine volume at a rate of 30, 60, 90, 180, 270 and 360 minutes and measure the pH and urinary electrolytes. To determine the safety, it was used the Acute Toxic Class Method according to guidelines for the testing of chemicals No. 423 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). It was found that the pH, electrolytes and urinary volumes of freeze-dried juice differed significantly from the negative control and the 2 reference drugs . It was obtained that the juice from the fruit of the lemon has a LD50 of 5000 mg /kg of body wieght. Wth the implementation of the freeze-dried juice and drugs in the experimental Biomodel, It is concluded that the juice from the fruit of the lemon produce an effect of increasing the pH, electrolytes and urinary volumes and that it is safe to administer at a dose of 5000 mg/kg in a single intake in 24 hours.

Key words: Diuresis, *Citrus limon L.* , Saluresis, Furosemide, Hydrochlorothiazide, OECD .

II. INTRODUCCIÓN

Últimamente se ha observado un incremento importante en el uso de las plantas medicinales para el tratamiento de ciertas enfermedades, que es debido a la milenaria herencia del uso de estos recursos naturales. Tiene que ver con el conocimiento popular transmitido a lo largo del tiempo de una generación a otra. Por tal motivo, la presente investigación tiene la intención de conjugar el saber folklórico tradicional con el conocimiento científico, para racionalizar el uso ancestral del zumo del limón como agente diurético.

El limón (*Citrus limon L.*) pertenece a la familia de las Rutaceae, su centro de origen es el Asia Central (posiblemente Irán). Hoy en día esta especie se cultiva en muchos países tropicales y subtropicales. El jugo del fruto contiene azúcares y ácidos orgánicos, principalmente, ácido cítrico. La epidermis del limón consta de 2 capas, la capa externa (pericarpio) contiene un aceite esencial (6%), que está mayormente compuesto de limoneno (90%), y citral (5%), además trazas de citronelal, alfa-terpineol, acetato de linalilo y geranilo. La capa interna (mesocarpio), no contiene aceites esenciales sino una variedad de glicósidos flavónicos amargos y derivados cumarínicos. Popularmente, se conocen sus propiedades digestivas, carminativas, diuréticas, depurativas y tónicas, entre otras.^(1,2)

Actualmente el 80% de la población de los países en desarrollo, utiliza la medicina tradicional y el 85% de ésta, usa extractos de plantas. Los diuréticos se emplean en tratamientos de hipertensión arterial, falla cardíaca congestiva, ascitis y edema. La Hidroclorotiazida y Furosemida se relacionan con un desbalance de electrolitos, diabetes, activación del sistema renina-angiotensina y disminución de la función sexual.⁽³⁾ Se justifica la búsqueda de nuevos diuréticos, potencialmente menos tóxicos; a partir de sustancias obtenidas de plantas por considerárseles relativamente seguras⁽⁴⁾. Por lo anteriormente citado, nos planteamos los siguientes objetivos secundarios: determinar la acción y actividad diurética del zumo del fruto del limón (*Citrus limón L.*); comparar el volumen de la diuresis, pH y las concentraciones de los electrolitos urinarios Na^+ , K^+ y Cl^- , producto del efecto diurético del zumo del fruto del limón (*Citrus limón L.*) frente a agentes diuréticos estándar (Furosemida e Hidroclorotiazida) y un control negativo; así como determinar la dosis letal 50 del zumo del fruto del limón (*Citrus limon L.*) en ratas albinas hembras de Cepa Holtzman.

III. GENERALIDADES

3.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA RENALES

La arteria renal principal se ramifica cerca del hilio renal en arterias segmentarias, que a su vez se subdividen para formar las arterias interlobulares que penetran al parénquima renal y forman una curva en el borde de la médula y corteza renales para formar vasos parecidos a un arco, conocidos como arterias arciformes. Estas últimas dan lugar a ramas perpendiculares llamadas arterias interlobulillares que entran en la corteza renal y llevan sangre a las arteriolas aferentes. Una arteriola aferente única penetra en el glomérulo de cada neurona, y se ramifican de modo extenso para formar el nexo capilar glomerular. Esas ramas muestran coalescencia y constituyen la arteriola eferente. Las arteriolas eferentes de los glomérulos superficiales ascienden hacia la superficie renal antes de dividirse en capilares peritubulares que riegan a los elementos tubulares de la corteza renal. Las arteriolas eferentes de glomérulos yuxtamedulares descienden hacia la médula y se dividen constituyendo los vasos rectos descendentes, los cuales suministran sangre a los capilares de la medula. La sangre que regresa desde esta última, por medio de los vasos rectos ascendentes, drena de manera directa hacia las venas arciformes, y la sangre que proviene de los capilares peritubulares de la corteza entra en las venas interlobulillares que a su vez se conectan con las venas arciformes, mismas que drenan hacia las venas interlobulares, las cuales a su vez drenan hacia venas segmentarias y la sangre sale de los riñones por medio de la vena renal principal. La unidad básica formadora de orina de los riñones es la nefrona, la cual consiste en un aparato de filtración, el glomérulo, conectado a una porción tubular larga que se resorbe y condiciona el ultrafiltrado glomerular. Cada riñón está compuesto de alrededor de un millón de nefronas. La nomenclatura para los segmentos de la porción tubular de la nefrona se ha tornado cada vez más compleja. Conforme a los fisiólogos renales, se ha subdividido la nefrona en segmentos cada vez más cortos, a los cuales se asignan nombres. Inicialmente esas subdivisiones se basaron en la localización axial de los segmentos, pero cada vez más la fundamentación se realiza con base en la morfología de la cubierta de las células epiteliales de los segmentos de la nefrona⁽⁵⁾.

3.2. ANATOMÍA FISIOLÓGICA DE LA VEJIGA

La vejiga urinaria, es una cámara muscular lisa formada por dos partes principales: 1) el cuerpo, que es la parte principal de la vejiga en donde se almacena la

orina y 2) el cuello, que es una extensión del cuerpo en forma de embudo dirigido hacia abajo y hacia delante en el triángulo urogenital y que comunica con la uretra. La parte inferior del cuello vesical recibe también el nombre de uretra posterior a causa de su relación con la uretra. El músculo liso de la vejiga recibe el nombre de músculo detrusor. Sus fibras musculares se extienden en todas direcciones y, cuando se contraen, pueden aumentar la presión en la vejiga hasta 40 a 60 mmHg. Por lo tanto, la contracción del músculo detrusor es un paso fundamental para vaciar la vejiga. Las células musculares lisas del músculo detrusor se hallan fusionadas de forma que la resistencia eléctrica entre unas y otras es baja y permite la propagación de los potenciales de acción a la totalidad del músculo, de una célula a la siguiente, produciendo la contracción en toda la vejiga de una vez. En la pared posterior de la vejiga, inmediatamente por encima del cuello vesical, existe una pequeña zona triangular llamada trígono. En el vértice inferior del trígono se encuentra la desembocadura de la vejiga a través del cuello vesical hacia la uretra posterior, mientras que los dos uréteres penetran en la vejiga por los ángulos superiores. El trígono puede identificarse por el hecho de que su mucosa, el revestimiento interno de la vejiga, es lisa, al contrario de lo que ocurre con el resto de la mucosa de la vejiga que es plegada y forma arrugas. Cuando penetran en la vejiga, los uréteres siguen un trayecto oblicuo a través del músculo detrusor y discurren de 1 a 2 cm por el espesor de la mucosa de la vejiga antes de vaciar en la cavidad. El cuello vesical (uretra posterior) posee una longitud de 2 a 3 cm, y su pared esta formada por el músculo detrusor, mezclado con una gran cantidad de tejido elástico. En esta zona, el músculo recibe el nombre de esfínter interno. Su tono natural mantiene normalmente vacíos de orina el cuello vesical y la uretra posterior, evitando el vaciamiento de la vejiga hasta que la presión en la porción principal de la vejiga supera un umbral crítico. La uretra, a partir de la uretra posterior, pasa por el diafragma urogenital, que contiene una capa de músculo llamada esfínter externo de la vejiga, formado por músculo esquelético voluntario, a diferencia del músculo del cuerpo y del cuello vesical, que sólo están formados por músculo liso. El músculo esfínter externo se encuentra bajo el control voluntario del sistema nervioso, y puede utilizarse para evitar conscientemente la micción, incluso aunque el control involuntario intente vaciar la vejiga. ⁽⁶⁾

El vago estimula y el simpático inhibe el vaciamiento de la vejiga. La influencia del simpático es de escasa importancia. El centro nervioso que controla el vaciamiento vesical está ubicado en la médula sacra. En condiciones fisiológicas el vaciamiento no se inicia por el aumento de la presión intravesical, sino por la distensión de sus paredes,

la que estimula receptores allí ubicados. Estos receptores emiten impulsos hacia el centro medular, desde el cual se transmiten impulsos por las vías eferentes simpática y parasimpática, que van a producir el vaciamiento. A pesar de que al evacuarse la orina disminuye la distensión vesical, no cesa el vaciamiento, lo que se debe a la estimulación, por el flujo de orina, de receptores situados en la uretra. Estos receptores mantienen, por vía refleja, la contracción de la musculatura de la vejiga y la relajación de los esfínteres tanto interno como externo. La destrucción del centro reflejo sacral produce retención de orina y aumento de la presión intravesical. En esta condición la vejiga no se distiende, por no producirse la disminución del tono que, como ya se ha señalado, ocurre normalmente al aumentar su contenido. En este caso el vaciamiento se hace por rebalse y en el momento en que la presión intravesical vence la resistencia ofrecida por el esfínter externo (incontinencia pasiva).

Al prolongarse esta situación, la elevada presión intravesical repercute sobre los uréteres, la pelvis renal y el riñón mismo, produciendo hidronefrosis que altera el funcionamiento renal. Si se seccionan las raíces posteriores sacrales, interrumpiéndose las fibras aferentes que transmiten los impulsos generados por la distensión de la vejiga y que van hacia el centro sacral, desaparece el vaciamiento reflejo, pero se conserva el voluntario. En este caso la micción puede realizarse, aunque con gran dificultad inicial, que disminuye progresiva y substancialmente con el tiempo. Conjuntamente con el centro medular sacral, ciertos centros superiores, situados principalmente en la región bulbo-protuberancial, ejercen influencia sobre el vaciamiento vesical⁽⁵⁾.

3.3. DIURÉTICOS

Son drogas con capacidad de incrementar el volumen de orina o la diuresis y disminuir el líquido excesivo del espacio extracelular. Los diuréticos tiazídicos que son los más utilizados clínicamente, aumentan también la excreción urinaria de sal, por lo que se los llama saluréticos o natriuréticos. Algunos diuréticos tienen además usos terapéuticos adicionales: en la hipertensión arterial, en el glaucoma y paradójicamente algunos son capaces de disminuir la diuresis o el volumen de orina en la diabetes insípida⁽⁷⁾.

Las drogas diuréticas se pueden clasificar según diversos criterios: la potencia diurética, la duración del efecto, el lugar de acción y la estructura química o mecanismo de acción⁽⁸⁾.

3.4. CLASIFICACIÓN DE DROGAS DIURÉTICAS

3.4.1. DIURÉTICOS INHIBIDORES DE LA REABSORCIÓN DE SODIO (SALURÉTICOS O NATRIURÉTICOS)

DIURÉTICOS TIAZÍDICOS : Son los diuréticos más importantes desde el punto de vista terapéutico. Su uso es amplio en el tratamiento de todos los síndromes edematosos, en la hipertensión arterial , en la diabetes insípida y en la hipercalciuria con litiasis cálcica recurrente.

Química : Son compuestos Sulfamídicos aromáticos derivados de las Benzotiadiazinas. Los derivados análogos solo difieren en potencia farmacológica o en su vida media u otros parámetros farmacocinéticos, pero no en su respuesta diurética óptima.

Mecanismo de acción: Los diuréticos Tiazídicos como muchos ácidos orgánicos débiles, se secretan activamente en la Pars recta del túbulo contorneado proximal. Este proceso puede ser inhibido con la administración de Probenecid, este mismo proceso también es responsable de la hiperuricemia que ocasionalmente puede observarse con el uso de las tiazidas, ya que compiten con la secreción del ácido úrico. Los diuréticos tiazídicos ejercen su acción de inhibición de la reabsorción tubular de sodio desde el fluido tubular, al que se incorporan por ese mecanismo ⁽⁷⁾ .

3.4.2. DIURÉTICOS DE ALTA EFICACIA

Furosemida, Bumetanida, y Ácido Etacrínico, poseen una intensidad diurética mucho mayor que las Tiazidas. Su acción comienza antes de los 30 minutos por vía oral, y su duración es relativamente leve, de 4-6 horas,

Química : La furosemida, es un derivado del ácido antranílico; el ácido etacrínico del ácido arilacético y la bumetanida del ácido 3-aminobenzoico.

Mecanismo de acción: Los diuréticos de alta eficacia, o llamados también diuréticos del asa, actúan inhibiendo la reabsorción tubular del Na⁺ y Cl⁻, en el

segmento medular y cortical de la rama ascendente gruesa del asa de Henle. La acción se relaciona con una inhibición de la enzima Na-KATPasa. La Furosemida y Bumetanida, también inhiben a la anhidrasa carbónica, pero esta acción es muy débil para ser importante. También aumentan el flujo sanguíneo renal, y el riego sanguíneo de la médula renal, pudiendo así interferir con el mecanismo multiplicador de contracorriente, que necesita que la médula renal, sea hipertónica. De cualquier manera, estos diuréticos, aumentan definidamente la excreción de sodio, cloruro, potasio , y agua ⁽⁷⁾ . Se presentan efectos secundarios menos frecuentes como erupción cutánea, aplasia de médula ósea, pancreatitis, acufenos, vértigo, sordera, agranulocitosis y fotosensibilidad.⁽⁸⁾ .

3.4.3. DIURÉTICOS AHORRADORES DE POTASIO.

ESPIRONOLACTONA: Este agente esteroide es un antagonista competitivo de la aldosterona. La Espironolactona se liga al receptor proteico citosólico e impide, que este adquiera la configuración activa. Se anula así la traslocación al núcleo, y los efectos que llevan a la síntesis de proteínas de transporte activo. El bloqueo de la acción de la aldosterona en el túbulo distal, y túbulo contorneado produce, (al contrario de la aldosterona), un aumento de la excreción de Na⁺ y Cl⁻, y una disminución de la eliminación de potasio, hidrógeno, y amonio. El efecto de la Espironolactona, solo es evidente en presencia de aldosterona, por lo tanto es ineficaz en la enfermedad de Addison, tiene poco valor en tratamiento de la preeclamsia, o de la insuficiencia cardíaca congestiva que cursan con escasa secreción de aldosterona; en cambio la Espironolactona puede ser útil en el tratamiento del edema del síndrome nefrótico, o de la cirrosis hepática, que cursan con altos niveles de aldosterona, La *Canrenona*, es un metabolito de la Espironolactona que puede convertirse hidrolíticamente en Canreonato de potasio. La Canrenona es también un antagonista competitivo de la aldosterona, que contribuye con la actividad biológica de la Espironolactona.

Farmacocinética: La Espironolactona, se absorbe bien por vía oral. Sufre una importante metabolización en su primer paso por el hígado. Circula ampliamente ligada a las proteínas plasmáticas. Como vimos el principal metabolito es la Canrenona.

AMILORIDA Y TRIAMTIRENE: Estos agentes tienen una moderada acción natriurética, diurética y un importante efecto ahorrador de potasio. Químicamente son bases orgánicas. El Triamtirene es una Pteridina y la Amilorida un derivado de la Pirazina. Su mecanismo de acción se desarrolla en el Túbulo, colector, segmento cortical, que es el sitio de mayor eliminación de potasio, tanto por transporte activo como pasivo. Estos agentes producen una disminución de la reabsorción de sodio en el fluido colector, en consecuencia ocurre una inhibición de la formación de un potencial negativo intraluminal, necesario para la secreción o eliminación del potasio. Así se elimina moderadamente sodio, cloro y agua y se retiene potasio,

Farmacocinética : Amilorida y Triamtirene se administran por vía oral, usualmente en combinación con Hidroclorotiazidas u otras Tiazidas. El Triamtireno se liga a proteínas plasmáticas en un 60% y se metaboliza ampliamente en el hígado. La Amilorida circula casi libremente en el plasma y no se metaboliza, eliminándose en forma inalterada. La Amilorida y Triamtireno o sus metabolitos se secretan activamente en el túbulo proximal, por el mecanismo de los cationes orgánicos ⁽⁷⁾ .

Los efectos adversos son hiponatremia, acidosis metabólica, debilidad muscular, impotencia, cefalea, trastornos gastrointestinales, y con menor frecuencia, fotosensibilidad y anafilaxia ⁽⁸⁾ .

3.4.4. DIURÉTICOS OSMÓTICOS

Mecanismo de acción : Los diuréticos osmóticos(Manitol al 15-20 %, y Úrea), son sustancias que en solución son marcadamente hipertónicas. Estas drogas cuando se administran por vía intravenosa, filtran por el glomérulo, no se reabsorben o lo hacen muy escasamente por los túbulos por lo que allí ejercen una presión osmótica, reteniendo agua. También interfieren con la reabsorción de sodio y cloruro. Ello produce en consecuencia, una intensa diuresis osmótica. El Manitol prácticamente no se reabsorbe en los túbulos renales y la Úrea solamente se absorbe en un 50%. Ambos agentes, filtran en el glomérulo, aún en el caso de shock hipovolémico con marcada hipotensión arterial, marcada deshidratación, o en el shock traumático. En este caso los solutos normales del

fluido tubular sufren una reabsorción muy completa, que provoca una gran disminución del flujo urinario (oliguria o anuria). La administración de cloruro de sodio con el filtrado glomerular muy disminuido para esta sal, no aumenta la diuresis porque la reabsorción tubular es prácticamente total. En cambio el Manitol (o la Úrea), sigue filtrándose por el glomérulo, no se reabsorbe en los túbulos, arrastra agua por efecto osmótico y aumenta o mantiene el volumen urinario, impidiendo la anuria ⁽⁷⁾.

Farmacocinética : Los diuréticos osmóticos así como no se reabsorben en los túbulos renales, tampoco se absorben o lo hacen con dificultad por el epitelio intestinal, por lo que se deben dar por vía intravenosa , en infusiones continuas. Son agentes inocuos o inertes, y no se metabolizan. La elevación de la osmolaridad, produce un aumento o arrastre del pasaje de agua hacia la sangre con una tendencia a la expansión plasmática o hipervolemia. También es posible por este mecanismo una reducción de edemas cerebrales y de la presión y volumen del líquido céfalo raquídeo , los resultados, sin embargo no son concluyentes ⁽⁷⁾ .

Los diuréticos osmóticos están contraindicados en los pacientes con anuria debido a enfermedad renal y en los que no han respondido a dosis de prueba de los fármacos ⁽⁸⁾ .

3.4.5. DIURÉTICOS INHIBIDORES DE LA ANHIDRASA CARBÓNICA

La anhidrasa carbónica es una enzima que cataliza la reacción $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_3\text{H}_2$. La enzima se encuentra distribuida ampliamente en todos los tejidos, y para que los inhibidores de la anhidrasa carbónica, sean efectivos debe inhibirse el 99% de la actividad enzimática.

Mecanismo de acción : La anhidrasa carbónica renal se encuentra en la membrana luminal de las células epiteliales tubulares y en el citoplasma de las mismas. El 90% del bicarbonato filtrado, es reabsorbido en el túbulo proximal. La membrana luminal es impermeable para el ion bicarbonato (CO_3H^-) por lo que es necesario un intercambio de H^+ (que se excretan por secreción activa al fluido tubular) por iones de sodio. El efecto neto es que el CO_3HNa es reabsorbido del túbulo hacia el líquido intersticial y al plasma. La reabsorción

de sodio y bicarbonato se acompañan de una reabsorción pasiva de un volumen osmóticamente equivalente al agua. Así el intercambio de iones de H^+ por iones de Na^+ y la reabsorción del bicarbonato de sodio produce una orina ligeramente ácida y con poco bicarbonato. La inhibición de la anhidrasa carbónica por la Acetazolamida por ejemplo, disminuye la reabsorción de bicarbonato en el túbulo proximal e impide la acidificación de la orina en el túbulo distal. La eliminación aumentada de bicarbonato se acompaña de una de eliminación también aumentada de sodio y potasio, y el resultado es un aumento de la diuresis.

Farmacocinética: La Acetazolamida, y los inhibidores de la anhidrasa carbónica, se reabsorben por vía oral. Su máxima concentración plasmática, se alcanza a las dos horas, se excreta por riñón, no se metaboliza, y se liga estrechamente a la enzima anhidrasa carbónica.⁽⁷⁾

Los inhibidores de la anhidrasa carbónica pueden provocar acidosis metabólica hiperclorémica, fosfaturia e hipercalciuria con producción de cálculos renales, hipopotasemia intensa y reacciones de hipersensibilidad⁽⁸⁾.

3.5. HIPERTENSIÓN ARTERIAL.

El aumento de la presión arterial es un problema sanitario extraordinario por tres razones principales : es común , sus consecuencias son extensas y a veces devastadoras y permanece asintomático hasta etapas tardías de su evolución . La OMS y el Comité de Detección, Evaluación y tratamiento de la Hipertensión de EE, UU, (CDETH) emplean como cifras de presión arterial normal las menores de 90 mmHg como diastólica y valores inferiores de 140 mmHg en lo referente a la sistólica, la cual varía según la edad, el sexo y el grupo socio-racial . Se considera Hipertensión Arterial (HA) a valores por arriba de los mencionados registrados en por lo menos dos determinaciones en días diferentes. Otro punto fundamental en el concepto de hipertensión arterial es la lesión a órganos blancos. Ello implica que si un paciente de primera aparición presenta datos clínicos o paraclínicos de lesión orgánica por hipertensión se le considera hipertenso, independientemente de las cifras que manifieste en ese momento. También se considera hipertenso el paciente que al ser valorado clínicamente este recibiendo medicación antihipertensiva, sin tomar en cuenta los valores que presente.

Es importante tener presente los siguientes preceptos en la fisiopatología de la Hipertensión Arterial : la presión sistólica máxima se debe al volumen y la velocidad de expulsión ventricular izquierda, la resistencia arteriolar periférica, la distensibilidad de la pared arterial, la viscosidad de la sangre y el volumen telediastólico en el sistema arterial. La disminución subsecuente en la presión durante la diástole depende a la vez de la viscosidad de la sangre, la distensibilidad arterial, la resistencia periférica al flujo sanguíneo y la duración del ciclo cardíaco. Los siguientes factores físicos influyen de manera importante sobre la distensibilidad arterial :

1. El modelo elástico de la pared, la relación entre la fuerza que actúa para deformarla y la distensión (deformación proporcional),
2. La geometría de la pared arterial, es decir, el radio interno y el grosor que gobiernan la tensión de aquella,

La disminución en la elasticidad o el incremento en el radio dan por resultado una reducción de la distensibilidad y una mayor elevación en la presión por unidad de volumen de sangre. Presión arterial media (PAM) es el valor medio de todas las presiones medidas milisegundo a milisegundo, en todo el ciclo de las presiones del pulso a lo largo de un tiempo determinado ; también se puede afirmar que es la fuerza media que tiende a impulsar la sangre por todo el sistema circulatorio. Presión arterial sistólica (PAS) es el nivel de presión que presenta la escala del esfigmomanómetro cuando aparecen los primeros ruidos brillantes (escala de Korotkoff) y es equivalente a la presión que ejerce la sangre contra las paredes arteriales cuando los ventrículos entran en sístole. Presión arterial diastólica (PAD) es el nivel de presión que presenta la escala del esfigmomanómetro cuando desaparecen todos los ruidos y es equivalente a la fuerza ejercida por la sangre contra las paredes arteriales cuando los ventrículos se encuentran en diástole.

Muchos factores contribuyen a las variaciones en la presión arterial de un individuo durante sus actividades diarias :

- a. Postura corporal.
- b. Estado de la actividad muscular, cerebral o gastrointestinal.
- c. Estímulos emocionales o dolorosos.
- d. Factores ambientales tales como temperatura e intensidad de ruidos.
- e. Empleo de tabaco, café y otras drogas con propiedades vasomotoras por vía directa o neural.

El patrón diurno promedio de la presión arterial consta de un incremento durante todo el día y al anochecer, una declinación rápida e importante a valores bajos durante la fase inicial profunda del sueño.

3.5.1. FACTORES RELACIONADOS CON LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Se han asociado los siguientes elementos como agentes estrechamente relacionados con la aparición de las diferentes formas clínicas de hipertensión arterial :

1. Personalidad impulsiva, sensible y perfeccionista
2. Raza negra (es mas severa la hipertensión arterial)
3. Obesidad
4. Uso y abuso de sal
5. Herencia
6. Nivel educacional
7. Consumo de cigarrillos
8. Sedentarismo.

Cerca del 90% al 95% de la hipertensión arterial es idiopática y aparentemente primaria (hipertensión esencial). El restante 5 a 10% corresponde a la hipertensión secundaria. En la mayor parte de los casos, la hipertensión se mantiene un nivel modesto y completamente estable durante años a decenios. Esta forma de trastorno se denomina hipertensión idiopática, esencial o hipertensión benigna . Aunque un curso benigno sea mas característico de la hipertensión idiopática o esencial , también puede verse en el trastorno secundario. Cerca del 5% de las personas hipertensas muestran un aumento rápido de la presión arterial, la cual si no se trata, conduce a la muerte en 1 a 2 años, denominándose hipertensión acelerada o maligna ⁽⁹⁾ .

3.5.2. TERAPIA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Los fármacos mejor tolerados en el tratamiento de la hipertensión son los diuréticos (especialmente a dosis bajas), los inhibidores de la enzima convertidora

de angiotensina, los bloqueadores del receptor de la angiotensina y los calcioantagonistas. Los diuréticos solos y asociados a bloqueadores β reducen la mortalidad en los hipertensos, como han demostrado grandes estudios clínicos ⁽¹⁰⁾.

Algunos consultores de The Medical Letter, creen que los calcioantagonistas deben reservarse para los pacientes que no responden o no toleran los diuréticos, los bloqueadores β o los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina. En algunos tipos especiales de pacientes ciertos fármacos pueden tener ventajas. Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina deben considerarse en pacientes con diabetes, especialmente si presentan nefropatía, o insuficiencia cardíaca congestiva o disfunción ventricular izquierda. Los bloqueadores β pueden ser la mejor elección en los hipertensos con angina de pecho y los que han padecido de un infarto de miocardio. En los pacientes con hiperlipidemia, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un bloqueador β o un calcioantagonista sería una buena elección. Los diuréticos y los calcioantagonistas son más eficaces que los bloqueadores β , los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y los bloqueadores del receptor de la angiotensina en los pacientes de raza negra. Un diurético con o sin un bloqueador adrenérgico o bien un calcioantagonista dihidropiridínico de acción corta son preferibles en los ancianos con hipertensión sistólica aislada, incluso si se escogen atentamente los fármacos para ajustarse a las necesidades individuales, la respuesta de cada paciente puede ser distinta. Si el fármaco escogido en primera elección es ineficaz o mal tolerado, debe cambiarse por otro de una familia farmacológica distinta, La JNC IV recomienda que la presión arterial objetivo en el paciente hipertenso en general debe ser menor a 130/85 mmHg ; mientras que en el paciente hipertenso con proteinuria menor de 125/75 mmHg ^(11, 12).

En el tratamiento de la Hipertensión Arterial, la elección del fármaco antihipertensivo o de la combinación de varios de ellos debe ser un proceso individualizado para cada paciente, con la indicaciones y contraindicaciones de cada grupo farmacológico ⁽⁸⁾.

3.6. EDEMA

Acumulación anormalmente grande de agua y electrolitos en el espacio extracelular. Para que el edema sea clínicamente ostensible es necesario que la retención líquida alcance aproximadamente al 10% del peso corporal. La composición química del líquido del edema es similar a la del plasma en lo referente a electrolitos y cristaloideos no electrolitos. En cambio el contenido en proteínas es variable según la etiología y mecanismos del edema ⁽⁷⁾ .

3.6.1. FISIOPATOLOGÍA DE LOS EDEMAS: Depende de la etiología de la patología que causa el edema. A su vez la elección del diurético depende parcialmente al menos, de la etiología del edema. La formación de edema ocurre principalmente por las siguientes causas:

- a: Aumento de la presión hidrostática en el capilar.
- b: Disminución de la presión coloidosmótica u oncótica del plasma (hipoproteinemia).
- c: Aumento del contenido proteico en el fluido intersticial (por ejemplo, en procesos inflamatorios).
- d: Aumento de la secreción de la aldosterona (por ejemplo, aldosteronismo secundario) que ocasiona una absorción aumentada de sodio en el túbulo distal y colector de los riñones. Lo mismo ocurre con los efectos mineralocorticoides de los glucocorticoides y hormonas sexuales.

El edema generalmente constituye un signo o un síntoma de una enfermedad subyacente y no una patología específica intrínseca en sí misma, Por ello el tratamiento de las enfermedades que producen los edemas deben estar orientados a:

- a)Terapéutica específica de la enfermedad primaria
- b) Incremento de la diuresis, por el uso de diuréticos,
- c) Reducción de la cantidad de sodio de la dieta (dieta hiposódica),

Los principales tipos de edemas son los siguientes:

a)**Edema cardíaco:** En la insuficiencia cardíaca congestiva, existe un aumento de la presión venosa cervical, aumento de la presión capilar , disminución del flujo sanguíneo renal, y de la filtración glomerular. Como consecuencia se produce un incremento del fluido intersticial y disminuye la eliminación de agua y solutos. El tratamiento de base se realiza con cardiotónicos.

b)**Cirrosis hepática:** En esta enfermedad hay fibrosis hepática, destrucción de hepatocitos y aumento de la presión en los capilares del sistema venoso portal (hipertensión portal). Por la grave alteración de la función hepática se altera la síntesis normal de proteínas lo que ocasiona hipoproteinemia y agravamiento del edema. En la cirrosis hay **edema y ascitis** por el mismo mecanismo. Ambos problemas tienden a agravarse por la hipovolemia que trae aparejado una disminución del flujo sanguíneo renal y aumento de la secreción de aldosterona (mayor retención de sodio), reduciéndose aún mas la eliminación de agua y sodio hay disminución de la aldosterona por la disfunción hepática, otro factor de agravación del edema.

c)**Síndrome nefrótico :** Por el padecimiento renal existe, un aumento de la permeabilidad glomerular a las proteínas (proteinuria) hipoproteinemia consecutiva y disminución de la presión oncótica y coloidosmótica del plasma. Esto además produce un aumento de la secreción de aldosterona y edema por estos motivos.

d)**Edemas del embarazo y edemas cíclicos:** Están relacionados con las acciones de los estrógenos sobre el agua y electrolitos (retención de Na), aumento de aldosterona (retención hidrosalina).

e)**Edemas nutricionales:** por hiponutrición, falta de aporte calórico de proteínas,.Ocurre principalmente por hipoproteinemias y disminución de la presión oncótica en el plasma ⁽⁷⁾ .

3.7. ASPECTOS BOTÁNICOS DEL *Citrus limon L.*

3.7.1. UBICACIÓN SISTEMÁTICA

La sistemática la clasifica de acuerdo al siguiente orden :

DIVISION	:	SPERMATOPHYTA
SUB-DIVISION	:	ANGIOSPERMAE
CLASE	:	DICOTYLEDONEAE
SUBCLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	SAPINDALES
FAMILIA	:	RUTACEAE
GENERO	:	Citrus
ESPECIE	:	<i>Citrus limon L. Burman f.</i>
Nombre Vulgar	:	“Limón” ,

La sistemática ha sido determinada según el sistema de clasificación de Engler y Prantl modificado por Melchier de 1964 .

Fue realizada bajo la dirección del Mg. Raúl Soria López , Jefe del Laboratorio de Farmacobotánica del Departamento Académico de Farmacología, Bromatología y Toxicología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos .

3.7.2. CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA

Arboles, arbustos leñosos, rara vez yerbas; hojas esparcidas u opuestas, simples o compuestas, glabras y con puntos translúcidos debido a las glándulas oleíferas; flores actinomorfas, raramente zigomorfas, cáliz y corola tetrámeros o pentámeros , estambres 4 o más y a menudo con los filamentos ensanchados en la base o concrecentes ; tálamo desarrollado generalmente en forma de disco entre los estambres o por encima de los mismos; carpelos 4 a 5 veces en mayor numero o reducidos a uno, libres en la región ovárica con los estilos o estigmas concrecentes, ovario supero sincárpico; fruto muy variado : esquizocárpico o en cápsula, drupa o baya .

Es muy característica de todas las Rutaceae la presencia de cavidades secretorias en el parénquima de los órganos vegetativos, en las que se contienen aceites esenciales, En varios géneros (*Citrus*) se observan espinas en la base de los brotes laterales, A veces se presentan diferencias en la morfología floral como flores unisexuales, aumento del numero de estambres y aborto de un verticilo periántico ⁽¹³⁾ .

3.7.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL LIMÓN

Tiene las hojas grandes coriáceas, con una espina que puede nacerles junto a su base, de bordes finamente festoneados y con numerosos puntos claros, vistas las hojas a contraluz, los pétalos suelen tomar un ligero tinte rosado por su parte externa y quedan blancos en su interior. Los limones son de figura elipsoidal, un poco alargada y con un mamelón en su extremo de corteza gruesa y no tan rugosa, de color amarillo de azufre . La parte carnosa esta dividida en diversos gajos y es muy ácida ⁽¹⁴⁾ .

3.7.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA

El jugo contiene ácido cítrico que varían entre 5-10 %, pectina, flavonoides como la hesperidina (glucosido), minerales como el potasio y el calcio, vitaminas (A,B y C). El ácido cítrico se halla combinado en forma de ester etílico. Además el mismo jugo contiene menores cantidades de otros ácidos, tales como el málico, cafeíco, acético y fórmico .En las hojas encontramos cafeína. En la corteza del fruto abunda la esencia del limón; aproximadamente se pueden sacar 3 g, de esencia por cada kilogramo de limones. La cáscara contiene aceites esenciales (2.5 %) , d-limonina (70%),

,alfabergamoteno, alfa pineno, alfa terpineno, alfa tujeno, beta bisolobeno, beta bergamoteno, beta felandreno, citral, citronelol, sesquiterpenos, oxalato de calcio, limoneno, canfeno, felandreno, citronelal, terpinol, aldehído otílico, sabineno, acetato de linalilo, acetato de geranilo y citropteno ^(14, 15 y 16) .

COMPOSICION DE VITAMINAS Y MINERALES DEL LIMÓN EXPRESADO EN mg/100 g DE MUESTRA DE FRUTA FRESCA

Tiamina	0.010
Riboflavina.....	0.022
Piridoxina.....	1.69
Acido Ascórbico.....	20.84
Fósforo.....	17.50
Calcio.....	11.10
Fierro.....	0.20

COMPOSICIÓN QUÍMICO-BROMATOLÓGICA DEL LIMÓN EXPRESADO EN g/100g DE MUESTRA DE FRUTA FRESCA

Agua	91.19
Residuo Seco.....	8.81
Extracto Etéreo.....	0.05
Fibra.....	0.46
Proteínas	0.30
Cenizas.....	0.19
Glúcidos.....	7.70

Fuente : ⁽¹⁷⁾

COMPOSICIÓN ALIMENTARIA DEL JUGO DEL LIMÓN (POR CADA 100 g.)

Agua	91 gr
Proteínas	0.38 gr
Calorías	24 kcal
Fibra	0.5 gr
Potasio	124 mg
Calcio	7 mg
Fósforo	6 mg
Magnesio	6 mg
Vitamina C	46 mg

Fuente : ⁽¹⁶⁾

3.7.5. INFORMACIÓN POPULAR .

- **PARA DISENTERIA, DOLOR DE ESTÓMAGO, DIARREA Y CÓLICOS.**

Modo de empleo y dosificación : Tomar el jugo del limón cada mañana de la siguiente manera ; El primer día el jugo de 3 limones, , aumentándose 1 cada día hasta llegar a 9 limones y luego se disminuyen hasta 3 nuevamente .

- **PARA BAÑO DE ASIENTO.**

Preparación : Jugo del fruto

Vía de administración : Tópica

Modo de empleo y dosificación : Una taza en agua dos veces al día.

- **PARA CÓLICOS DEL ESTÓMAGO.**

Preparación : Se prepara el jugo del fruto.

Vía de administración : Oral.

Modo de empleo y dosificación : se toma el jugo en un vaso, tres veces al día .

- **PARA GRIPE, DOLOR DE CABEZA Y CUERPO, FORTALECER LA SANGRE**

Preparación : Se prepara el jugo del fruto.

Vía de administración : Oral.

Modo de empleo y dosificación : Se toma el jugo en un vaso , tres veces al día .

- **PARA GRIPE, TOS, DOLOR DE GARGANTA, PROBLEMAS RESPIRATORIOS.**

Preparación : El cogollo y/o el fruto se preparan en jarabe.

Vía de administración : Oral.

Modo de empleo y dosificación : Se toma una taza, tres veces al día .

- **DOLOR DE CABEZA.**

Modo de empleo y dosificación : El fruto sin ninguna preparación, se parte en rodajas y se coloca en apósitos dos veces al día en ambas sienes o sentidos .

- **PARA LA CALENTURA**

Preparación : Se hierve seis hojas en medio litro de agua .

Vía de administración : Oral

Modo de empleo y dosificación : Se toma un vaso tres veces al día .

- **PARA DOLORES MENSTRUALES (CÓLICOS DURANTE LA MENSTRUACIÓN)**

Modo de empleo y dosificación : Tomar una tacita de jugo de limón .

- **PARA LLAGAS REBELDES.**

Modo de empleo y dosificación : Se aplica el jugo de limón en las llagas .

- **PARA DIARREA Y CÓLICOS DEL ESTÓMAGO.**

Modo de empleo y dosificación : Se puede utilizar la corteza del árbol cocida .

- **PARA INFECCIONES EN LA GARGANTA.**

Modo de empleo y dosificación : Puede tomarse el jugo de limón con miel de palo .

- **INFLAMACIÓN ESTOMACAL O GASTRITIS.**

Modo de empleo y dosificación : El jugo del fruto se toma a razón de un vaso por las mañanas .

- **MAL DE ORIN (DIFICULTAD PARA ORINAR) Y NERVIOSISMO (ANSIEDAD).**

Preparación : se prepara el fruto en cocimiento ,

Vía de administración : Oral ,

Modo de empleo y dosificación : Tomar una taza tres veces al día .

- **RONCHAS, PÁPULAS Y PRURITO (PICAZÓN) .**

Preparación : El cogollo se prepara en cocimiento,

Vía de administración : Local ,

Modo de empleo y dosificación : Se hacen baños diarios hasta mejorar. ⁽¹⁸⁾

3.7.6. USOS .

- **ALIMENTO** : Se consume el jugo y se hacen mermeladas de la cascara del fruto.
- **ACEITE ESENCIAL** : Para perfumería.
- **ORNAMENTAL.**
- **MEDICINAL :**

CARACHA : Aplicar el jugo de limón fresco o cocinado en emplasto.

OTITIS : Instilar zumo de limón al oído.

ANTIPIRÉTICO: Tomar el cocimiento del fruto verde.

ANTIRREUMÁTICO : Masajes de limones podridos con alcanfor.

FARINGITIS Y AMIGDALITIS : Tomar jugo de limón con miel de abejas o hacer gárgaras con el jugo de limón puro.

MAREOS : Tomar jugo de limón con azúcar .

ANTIINFLAMATORIO : El jugo o emplasto de las hojas .

PARASITOSIS : Tomar el jugo de limón con un diente de ajo.

DIARREA : Te de las hojas .

TOS : Jugo de Limón con agua y miel .

ANTICASPA : Aplicar el zumo de limón al cuero cabelludo.

ANTIEMÉTICO : Tomar medio vaso de zumo de limón en ayunas .

INDIGESTIÓN : Tomar medio vaso de zumo de limón.

HEMORRAGIA NASAL : Poner dos gotas de jugo de limón en la fosa nasal sangrante.

RESFRÍO : Inhalar el líquido del cocimiento de un limón con un producto mentolado (Mentolatum o Vic vaporub).

HERIDAS : Aplicar el jugo de limón sobre la herida para desinfectar o lavar con el cocimiento concentrado de la corteza .

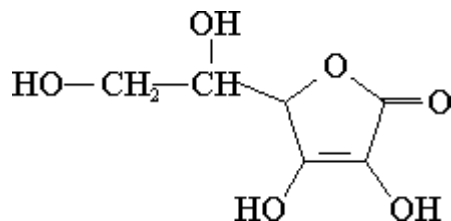
DIURÉTICO : Por el valor estimulante de la cafeína o el mismo ácido ascórbico, puede utilizarse como diurético en tratamientos de obesidad, al aumentar la micción, eliminando líquido corporal (Jugo de limón) ⁽¹⁵⁾.

Compuesto Químico	Parte	Cantidad
ÁCIDO ASCÓRBICO	Fruto	5,208 - 5,566 ppm
ÁCIDO CAFÉICO	Fruto	21 - 35 ppm
CAFEINA	Flor	0 - 50 ppm
CALCIO	Fruto	700 - 3,227 ppm
DIOSMINA	Fruto	0 - 5 ppm
FIBRA	Fruto	17,000 - 47,000 ppm
ISOPIMPINELLINA	Planta	-----
LUTEOLINA	Flor	-----
POTASIO	Fruto	0 - 14,700 ppm
TERPINEN-4-OL	Aceite Esencial	1 - 40 ppm
TERPINEN-4-OL	Aceite Esencial de la Hoja	0 - 10,000 ppm
TERPINEN-4-OL	Aceite Esencial del Pericarpo	1,000 - 11,000 ppm

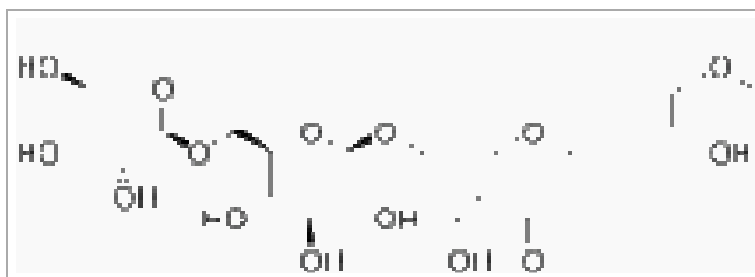
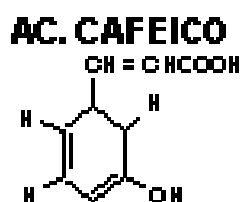
Fuente : ⁽¹⁹⁾

Figura N° 1.- Constituyentes químicos con actividad diurética en el Limón (*Citrus limon L.*).

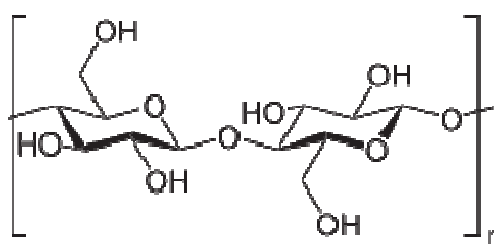
3.7.7. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE ALGUNOS CONSTITUYENTES QUÍMICOS DEL ZUMO DEL FRUTO DEL LIMÓN (*Citrus limon* L.) CON PROPIEDADES DIURÉTICAS.



Ácido Ascórbico



Diosmina (Flavona)



Fibra vegetal (Celulosa)

Fuente : ⁽²⁰⁾

Figura N° 2.- Estructuras químicas del zumo del fruto del Limón (*Citrus Limon* L). con propiedades diuréticas .

IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. ESTUDIO FARMACOLÓGICO

4.1.1. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Material Biológico

- Ratas albinas hembras Cepa holtzman de 2 meses $\frac{1}{2}$ de edad ; con peso corporal promedio de 200 +/- 50 g , Procedentes del bioterio del Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Chorrillos.
- Frutos del *Citrus Limon L.*

Material de Laboratorio

- Pipetas graduadas de vidrio pyrex de 1 mL, 2 mL y 10 mL,
- Propipetas
- Tubos de vidrio tapa rosca 15 x 100
- Beakers de vidrio pyrex de 100 mL , 500 mL , 1000 mL
- Baguetas de vidrio .

Equipos

- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 560
- Espectrofotómetro UV – Visible Genesys 20
- Balanza Analítica Ohaus
- Medidor de pH/ Potenciómetro Orión
- Refrigeradora de 16 p3 Coldex

Aparatos de Laboratorio

- Jaulas Metabólicas
- Balanza de animales de sensibilidad 0,1 g
- Trípodes
- Pinzas

- Cronometro

Reactivos Químicos

- Furosemida 20mg/2mL GEN-FAR
- Hidroclorotiazida 50 mg tabletas GEN-FAR
- Agua bidestilada .
- Suero fisiológico (NaCl 0.9 %).

4.1.2. PROCEDENCIA Y RECOLECCIÓN DEL MATERIAL BOTÁNICO

Los frutos del Limón , fueron recolectados en la estación de verano (mes de marzo) del año 2004 a las 6:00 a.m. en un terreno de cultivo en el kilometro 64 de la carretera Panamericana Sur, en el distrito de Chilca, provincia de Cañete y departamento de Lima . Sus limites son:

Norte: Distrito de San Bartolo

Noroeste: Distrito de Pucusana

Sur: Distrito de San Antonio

Este: Provincia de Huarochiri

Oeste: Océano Pacífico.



FIGURA N° 3 .- Ubicación del Distrito de Chilca.

4.1.2.1. RECOLECCIÓN :

La hora del día en que se realizó la recolección de cuatro kilogramos de frutos , fue a las 6:00 a.m. del 20 de Marzo del 2004 y una vez que había desaparecido el rocío, ya que esta hora se indica como el momento en que la cantidad de productos inactivos es menor , en cambio enriquecen a la planta en sus principios activos ⁽²¹⁾.

Lugar de colecta	ExFundo San José
Suelo	Agrícola bajo y restricciones por suelo, sales y agua .
Clima	Subtropical árido
Precipitación pluvial	0.3 mm/mes en Abril 4.0 mm/mes en Junio
Temperatura	28.9°C en Febrero y Marzo 19.3 ° C en Agosto
Altitud	3 m.s.n.m.
Latitud sur	12 21 12''
Longitud oeste	76 45 20''
Hábitat	Costa
Edad	Planta adulta
Estación	Todo el año
Zona de vida	zona calida o tropical

Fuente: ⁽²²⁾

FIGURA N° 4 .- Recolección del fruto del Limón (*Citrus limon L.*).

4.1.2.2. TRANSPORTE :

La muestra fue empacada en un Cooler (recipiente de plástico) y con cojinetes refrigerantes para obtener una temperatura homogénea de 4°C , durante todo el tiempo que demoró el trayecto (aproximadamente 2 horas) a fin de salvaguardar la estabilidad y buenas condiciones de los componentes del fruto .

4.1.2.3. LIOFILIZADO DEL ZUMO DE LIMÓN :

De los 4 kilogramos iniciales recolectados de frutos del limón que correspondían a 120 unidades ,se obtuvo 1,500 mL de zumo, es decir, que un limón produce aproximadamente 12.5 mL de zumo . Los zumos fueron preparados por expresión de frutos y posterior filtrado a través de un tamiz de 2 mm² y fueron deshidratados por liofilización en el laboratorio de Bioorgánica del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón ” de la facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Las muestras de zumo para la liofilización , se colocaron en recipientes de vidrio pirex de 100 mL de capacidad que se acoplan a un liofilizador marca Virtis , a una presión de 0.05 mbar y a una temperatura de – 52 °C por 10 horas continuas . La cantidad de liofilizado obtenido fue de 150 g (ya que la liofilización permite una reducción del peso inicial de 70 y 90 %) . El liofilizado obtenido se almacenó en bolsas de polietileno al vacío , conteniendo un porcentaje de agua residual de 2% (del agua inicial) de esta forma se impide el desarrollo microbiano y los cambios químicos se hacen inexistentes . Finalmente se relacionó que cada limón rinde 1.25 g de zumo liofilizado, esto es importante al momento de relacionar la dosificación adecuada a administrar a las ratas.

4.1. 2.4. CONSERVACIÓN :

Una vez deshidratadas las muestras por liofilización , se colocaron en el refrigerador , en la parte de la congeladora (Freezer) hasta el momento de ser utilizadas ^(23 y 24) .

4.1.3. DESARROLLO PROCEDIMENTAL

4.1.3.1.DETERMINACIÓN DE LA DIURESIS (Naik V, R, et al 1981 con modificaciones) ^(5, 15, 25, 26, 27) :

- Las ratas se mantuvieron una semana en climatización en el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en las siguientes condiciones : Ciclo de luz-oscuridad de 12 horas ; temperatura de 19-22 °C y una proporción de seis animales por caja con fondo de rejilla .
- Los animales estuvieron sin comida (ayuno) y agua 18 horas previas al inicio del experimento , así mismo durante las 6 horas de recolección de la orina .
- Para el estudio comparativo de zumo liofilizado se formaron 6 grupos de 8 ratas hembras, cada uno distribuidos aleatoriamente de la siguiente forma :
 1. Solución de NaCl 0.9%
 2. Furosemida : 10 mg/kg. de peso corporal.
 3. Hidroclorotiazida : 25 mg/Kg. de peso corporal.
 4. Zumo liofilizado del fruto del limón de 180 mg/Kg. de peso corporal
 5. Zumo liofilizado del fruto del limón de 540 mg/Kg. de peso corporal
 6. Zumo liofilizado del fruto del limón de 900 mg/Kg. de peso corporal.
- En todos los casos las sustancias de ensayo fueron administradas por la vía oral mediante cánula intragástrica a razón de 25 mL/Kg de peso corporal . Todas las disoluciones se prepararon en cloruro de sodio al 0.9% para igualar estos volúmenes ⁽²⁶⁾ .
- Se marcaron para su identificación, pesaron y colocaron las ratas en las jaulas metabólicas a razón de 1 animal por jaula (todas del mismo sexo), teniendo un total 8 animales por dosis a fin de asegurar la repetitividad por dosificación. ⁽²⁶⁾.
- Se recolecto la orina post-administración de agua destilada ,drogas, y zumos liofilizados durante 30, 60, 90, 180, 270 y 360 minutos. Registrar el volumen urinario .

4.1.3.2. DETERMINACIÓN DEL pH URINARIO ⁽²⁸⁾.

- El pH urinario se determinó por medio de un potenciómetro digital marca Orión con 2 electrodos : uno de vidrio y el otro de referencia de unión simple .

REACTIVOS

Ftalato hidrógeno potásico 0,05 M , $C_6H_4(COOH)(COOK)$ pH = 4,00 a 20 ° C ; pH = 4,01 a 25 ° C . Disolver 10,12 g de ftalato hidrógeno potásico, $C_6H_4(COOH)(COOK)$, secado a 120 ° C, en 1000 ml de agua destilada.

Fosfato potásico dihidrógeno 0,025 M (KH_2PO_4) y 0,025 M de fosfato disódico de hidrógeno (Na_2HPO_4) pH = 6,88 a 20 ° C ; pH = 6,86 a 25 ° C . Disolver 3,39 g fosfato potásico dihidrogeno, KH_2PO_4 , y 3,53 g de hidrógeno fosfato disódico, Na_2HPO_4 , secado a 120 ° C, en 1000 ml de agua destilada.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

- Se calibró el potenciómetro con las soluciones reguladoras (Buffers) de pH 4 y pH 7.
- Se tomó una porción de la muestra ya preparada, mezcló bien por medio de un agitador y ajusto su temperatura a $20^{\circ}C \pm 0,5^{\circ}C$.
- Se sumergió él (los) electrodo (s) en la muestra de manera que los cubra perfectamente.
- Se hizo la medición del pH. Se saco el (los) electrodo (s) y Enjuagó cuidadosamente los electrodos con agua destilada entre cada medición, y limpió el exceso de agua con un suave papel, El valor del pH de la muestra se leyó directamente en la escala del potenciómetro. Se

almacene los electrodos en solución de KCl 0,1 M .

4.1.3.3. DETERMINACIÓN DE SODIO Y POTASIO URINARIOS ⁽²⁹⁾ .

El Potasio y Sodio urinarios se determinaron mediante un espectrofotómetro de absorción atómica 560 , marca Perkin-Elmer.

REACTIVOS PARA SODIO

Solución Madre de Sodio : Disuélvase 2,542 g, de NaCl secados a 140 °C y dilúyase en con agua hasta 1000 mL , 1mL = 1 mg Na.

Solución de Sodio Intermedia : Dilúyase 10 mL de solución madre de sodio hasta 100 mL , empleando agua , 1mL = 100 mcg Na.

Solución patrón de Sodio : Dilúyase 10 mL de solución de Sodio intermedia hasta 100 mL con agua , 1 mL = 10 mcg Na . Utilice esta solución para preparar una curva de calibración en el intervalo 0,1 a 1 mg/L.

REACTIVOS PARA POTASIO .

Solución de Potasio de reserva : Disuélvase 1,9707 g, de KCl secados a 110 °C y dilúyase en con agua hasta 1000 mL , 1mL = 1 mg K.

Solución de Potasio Intermedia : Dilúyase 10 mL de solución de potasio de reserva hasta 100 mL , empleando agua , 1mL = 0,100 mg K.

Solución patrón de Potasio : Dilúyase 10 mL de solución de Sodio intermedia hasta 100 mL con agua , 1 mL = 0,010 mg K. Utilice esta solución para preparar una curva de calibración en el intervalo 0,1 a 1 mg/L.

MÉTODO OPERATORIO .

SODIO URINARIO

Se tomo 1 mL de orina y se llevo a volumen en una fiola de 50 ml con agua destilada o desionizada. Posteriormente se realizo la lectura al espectrofotómetro de absorción atómica con flama a una longitud de onda de 589,6 nm , potencia emitida de 0,092 y flujo de acetileno de 2 L/min ⁽²⁹⁾ .

POTASIO URINARIO

Se tomo 0,2 mL de orina y se llevo a volumen en una fiola de 50 ml con agua destilada o desionizada . Posteriormente se realizo la lectura al espectrofotómetro de absorción atómica con flama a una longitud de onda de 766,5 nm , potencia emitida de 0,055 y flujo de acetileno de 2 L/min. ⁽²⁹⁾ .

4.1.3.4. DETERMINACIÓN DE CLORURO URINARIO ⁽³⁰⁾ .

(KIT Cl – Color de WIENER LAB)

MUESTRA : ORINA

PROCEDIMIENTO :

EN ORINA: se aconseja trabajar directamente en tubos de fotocolorímetro, a fin de poder determinar un Blanco Interno para cada ensayo, condición indispensable para controlar las trazas de cloruros que pudieran haberse escapado al proceso de lavado del material. En dos tubos de fotocolorímetro marcados S (Estandar) y D (Desconocido) colocar:

	S	D
Reactivo de Color	4 mL	4 mL

Leer la absorbancia de ambos tubos (Blancos Internos: BS y BD) en espectrofotómetro a 450 nm o en fotocolorímetro con filtro azul (440-470 nm) llevando el aparato a cero con agua destilada. Luego agregar:

Standard	20 uL
-----------------	--------------

Mezclar inmediatamente con la varilla provista y volver a leer ($S_1 = 65$ meq/L).

Muestra	20 uL
----------------	--------------

Mezclar inmediatamente con la varilla provista (previamente enjuagada) y volver a leer (D_1) .

Standard	20 uL
-----------------	--------------

Mezclar y volver a leer de la misma manera el tubo S ($S_2 = 130$ meq/L).

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

La intensidad del color esta relacionada con la concentración de cloruros de la muestra por la ecuación de una recta cuya ordenada al origen depende de la respuesta del aparato de medida usado. Por esta razón, para expresar los resultados se requieren dos puntos de calibración (S_1 y S_2).

a.- Corregir las lecturas :

$$S_1 - BS = S_1' \quad ; \quad S_2 - BS = S_2' \quad ; \quad D_1 - BD = D_1'$$

b.- Calcular :

$$\text{Cloruros meq/L} = 65 \text{ meq/L} + (D \times f)$$

en donde :

$$D = D_1' - S_1' \quad \text{y} \quad f = \frac{65 \text{ meq/L}}{S_2' - S_1'}$$

4.1.3.5. DETERMINACIÓN DE LA EXCRECIÓN URINARIA , ACCIÓN Y ACTIVIDAD DIURÉTICA ⁽²⁵⁾ .

Se calcularon de acuerdo a las siguientes fórmulas :

$$\text{Excreción urinaria} = \frac{\text{Orina producida}}{\text{Solución fisiológica Administrada}} \times 100$$

$$\text{Acción diurética} = \frac{\text{Excreción urinaria del Grupo tratado}}{\text{Excreción urinaria del Grupo control}}$$

$$\text{Actividad diurética} = \frac{\text{Acción diurética del zumo liofilizado}}{\text{Acción diurética fármaco dependencia}}$$

Los datos a utilizar se expresan como valor medio .

4.2. ESTUDIO TOXICOLÓGICO

4.2.1. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA ORAL ⁽³¹⁾ .

4.2.1.1.DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL50)

Fundamento : La toxicidad Aguda Oral permite observar los efectos adversos que aparecen en un tiempo breve posterior a la administración de dosis únicas de un compuesto o dosis múltiples administradas en 24

horas, Es importante señalar que los ensayos de toxicidad aguda no son un sinónimo de mortalidad de los animales expuestos al agente en estudio, ya que se deberá también obtener una información amplia a partir de un estudio de toxicidad aguda correctamente diseñado que permita no solo un rápido conocimiento de la letalidad sino también, la existencia de signos y síntomas asociados a manifestaciones de toxicidad retardada y posibles órganos blanco de ataque ⁽³²⁾ .

4.2.1.2. MATERIALES Y EQUIPOS

Materiales :

06 ratas albinas hembras de Cepa Holtzman

Zumo liofilizado de limón

Jeringas descartables de 1 mL

Agujas N° 25

Sonda nasogástrica N° 18

Jaulas y bandejas plásticas (albergue para ratas)

Plumón marcador

Equipos :

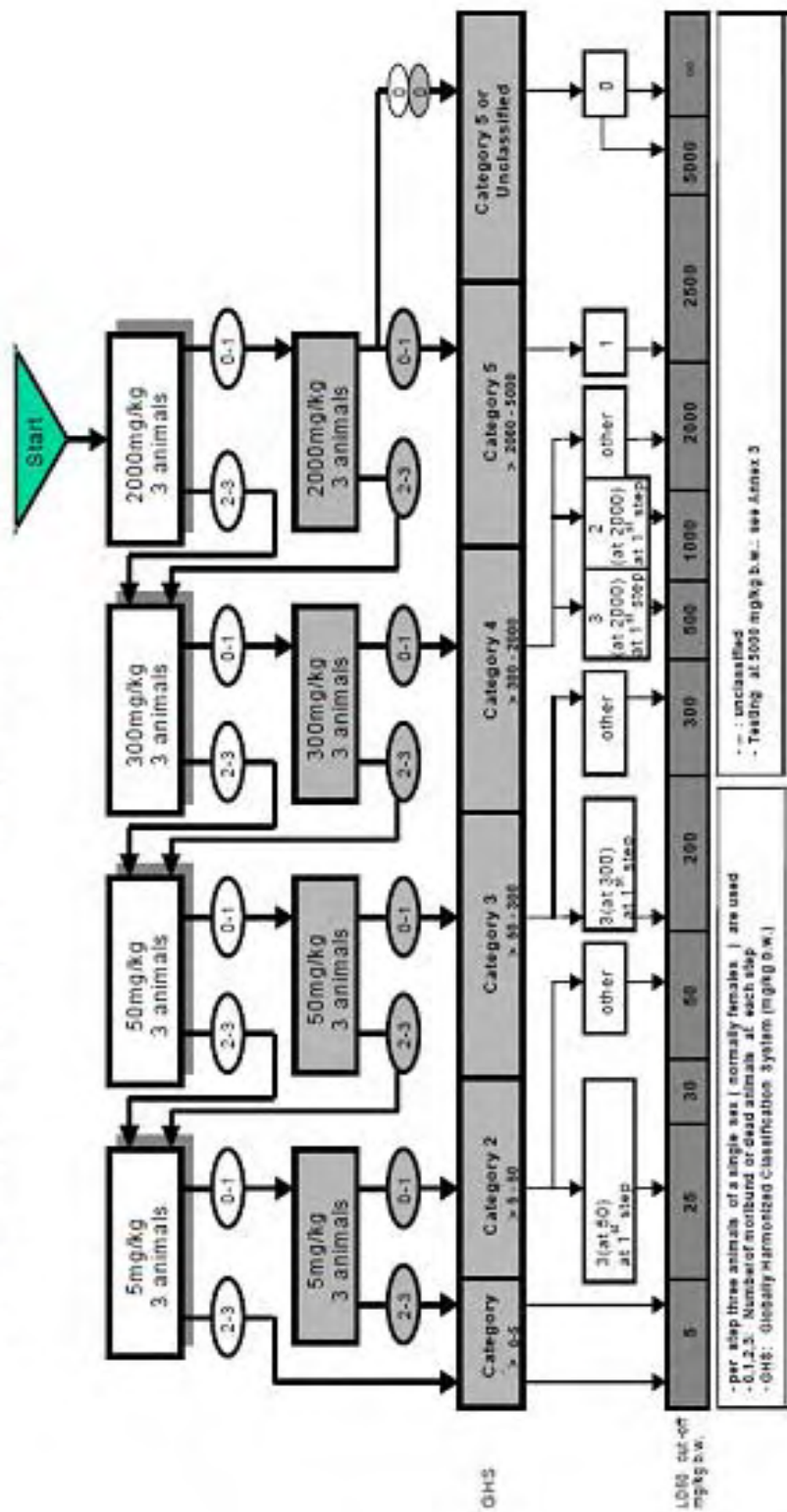
Balanza de animales (sensibilidad 0,1 g).

4.2.1.3. METODOLOGÍA EMPLEADA :

Según el Método de las Clases Tóxicas Agudas correspondiente a la Guía para los Ensayos de Sustancias Químicas N° 423 de la OECD (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico) de acuerdo al siguiente flujograma (FIGURA N° 3) ⁽³¹⁾ :

OECD/OCDE

ANNEX 2d: TEST PROCEDURE WITH A STARTING DOSE OF 2000 MG/KG BODY WEIGHT



Se utilizó la dosis más alta , por referencias bibliográficas de los componentes del zumo liofilizado. Se utilizaron 3 ratas por dosis, con un total de 6 ratas . Se observó el comportamiento de los animales durante 14 días . Se reportaron los signos y síntomas observados y se controlaron los pesos al inicio , a los siete días de administración y al finalizar el experimento . Se realizó la necropsia a todos los animales , al final del experimento y se evaluó la coloración, tamaño de los diferentes órganos y la histopatología . El sacrificio de los animales se realizo por el método de dislocación cervical ⁽³³⁾ .

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se determinó la media y la desviación estándar de los valores individuales obtenidos para cada grupo de animales para cada determinación. Las diferencias entre grupos los grupos tratados fueron determinados mediante análisis de varianza, test de Tukey en el programa estadístico SPSS (versión 13.0) , siendo considerado significativa una probabilidad menor de 0,05 .

V. RESULTADOS

5.1. ESTUDIO FARMACOLÓGICO

CUADRO N° 1.- VOLUMEN URINARIO (mL) SEGÚN TIEMPO EN EL CONTROL NEGATIVO (NaCl 0.9%)

ANOVA						Prueba de Tukey					
Volumen Urinario mL											
N	(Media)	Desviación típica	F	P		30 min.	60 min.	90 min.	180 min.	270 min.	360 min.
30 min.	8	0.43									
60 min.	8	0.60					*P>0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
90 min.	8	0.86				*P>0.05	*P>0.05	*P>0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
180 min.	8	1.58	223	0.001*		*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
270 min.	8	2.43				*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
360 min.	8	3.80				*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05

*P<0.05 existe diferencias significativas; ***P>0.05 no existe diferencias significativas.**

A medida que transcurre el tiempo, el volumen urinario se incrementa significativamente (p<0.05) al administrarse el control negativo (NaCl 0.9 %).

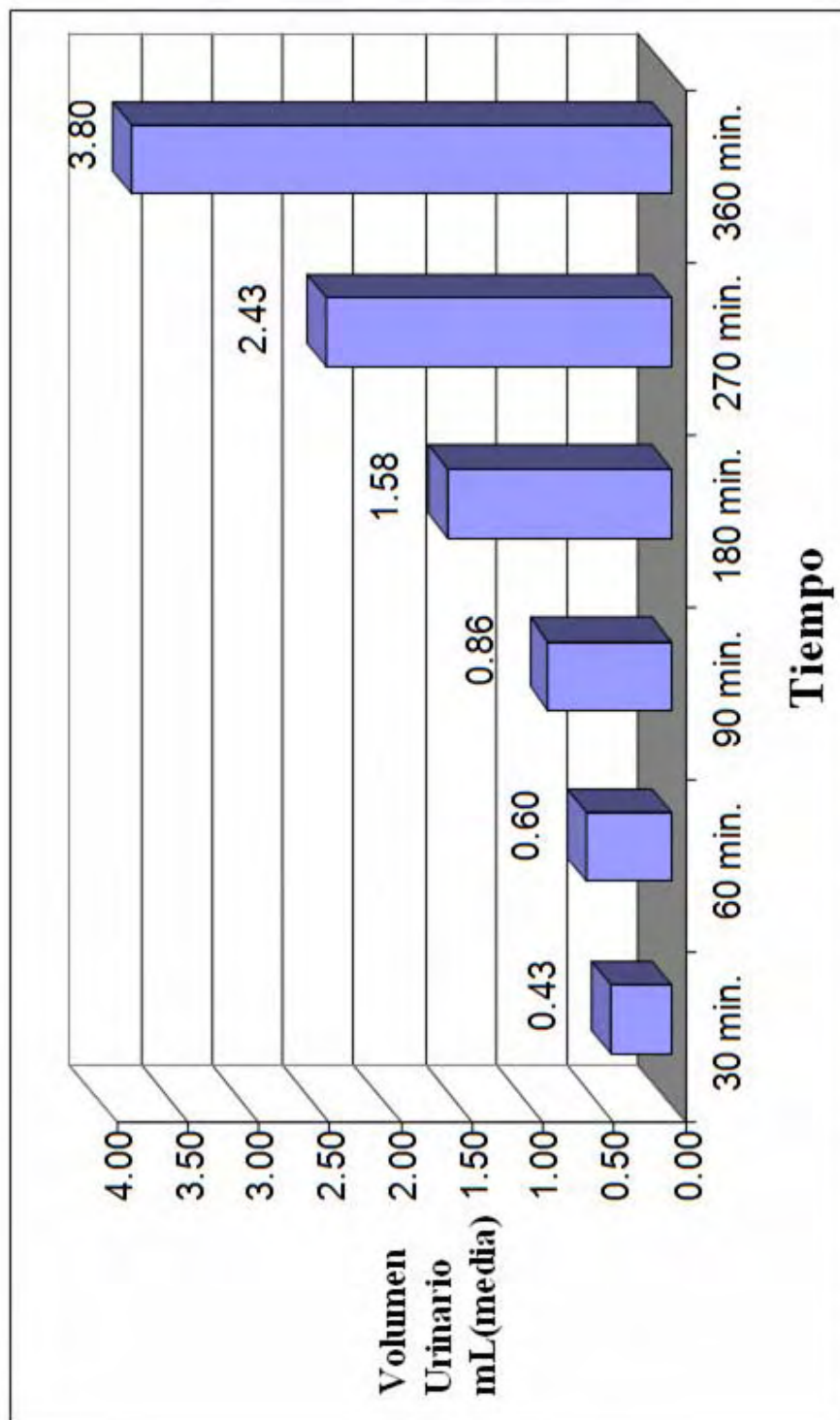


FIGURA N° 6.- VOLUMEN URINARIO (mL) SEGÚN TIEMPO EN EL CONTROL NEGATIVO. (NaCl 0.9%)

CUADRO N° 2 .VOLUMEN URINARIO (mL) SEGÚN EL TIEMPO EN EL CONTROL POSITIVO FUROSEMIDA (10 mg/Kg)

ANOVA					Prueba de Tukey						
Volumen Urinario											
	N	mL (media)	Desviación típica	F	P	30 min.	60 min.	90 min.	180 min.	270 min.	360 min.
30 min.	8	0.98	0.13								
60 min.	8	2.63	0.23								
90 min.	8	3.50	0.18	551	0.001*	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
180 min.	8	3.82	0.15			*P<0.05	*P>0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
270 min.	8	3.95	0.13			*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P>0.05	*P<0.05
360 min.	8	4.78	0.11			*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05

*P<0.05 existe diferencias significativas; *P>0.05 no existe diferencias significativas.

A medida que transcurre el tiempo el volumen urinario se incrementa significativamente (p<0.05) al administrarse el Control Positivo Furosemida (10 mg/Kg)

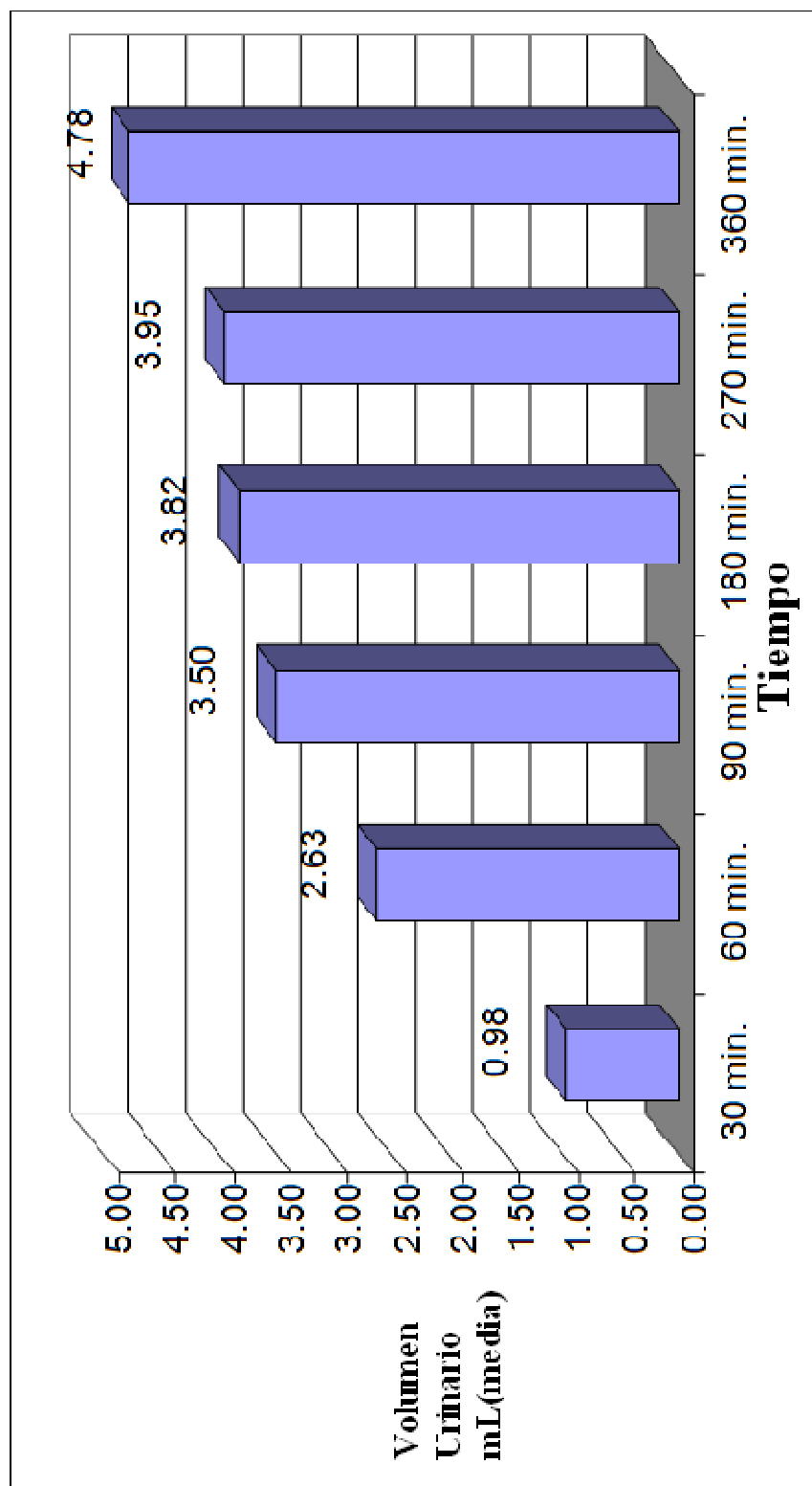


FIGURA N°7. VOLUMEN URINARIO(mL) SEGÚN EL TIEMPO EN EL CONTROL POSITIVO FUROSEMIDA (10 mg/Kg)

CUADRO N°3. VOLUMEN URINARIO (mL) SEGÚN TIEMPO EN EL CONTROL POSITIVO DE HIDROCLOROTIAZIDA (HCT 25mg/Kg).

ANOVA				Prueba de Tukey								
Volumen Urinario mL												
		Desviación típica										
	N	(media)	F	P	30 min.	60 min.	90 min.	180 min.	270 min.	360 min.		
30 min.	8	0.53	0.17									
60 min.	8	1.24	0.24									
90 min.	8	2.43	0.62									
180 min.	8	3.99	0.41	316	0.001*							
270 min.	8	5.21	0.44									
360 min.	8	7.33	0.40									

*p<0.05 existe diferencias significativas; *P>0.05 no existe diferencias significativas.

A medida que transcurre el tiempo el volumen urinario se incrementa significativamente (P < 0.05) cuando se administra la Hidroclorotiazida.

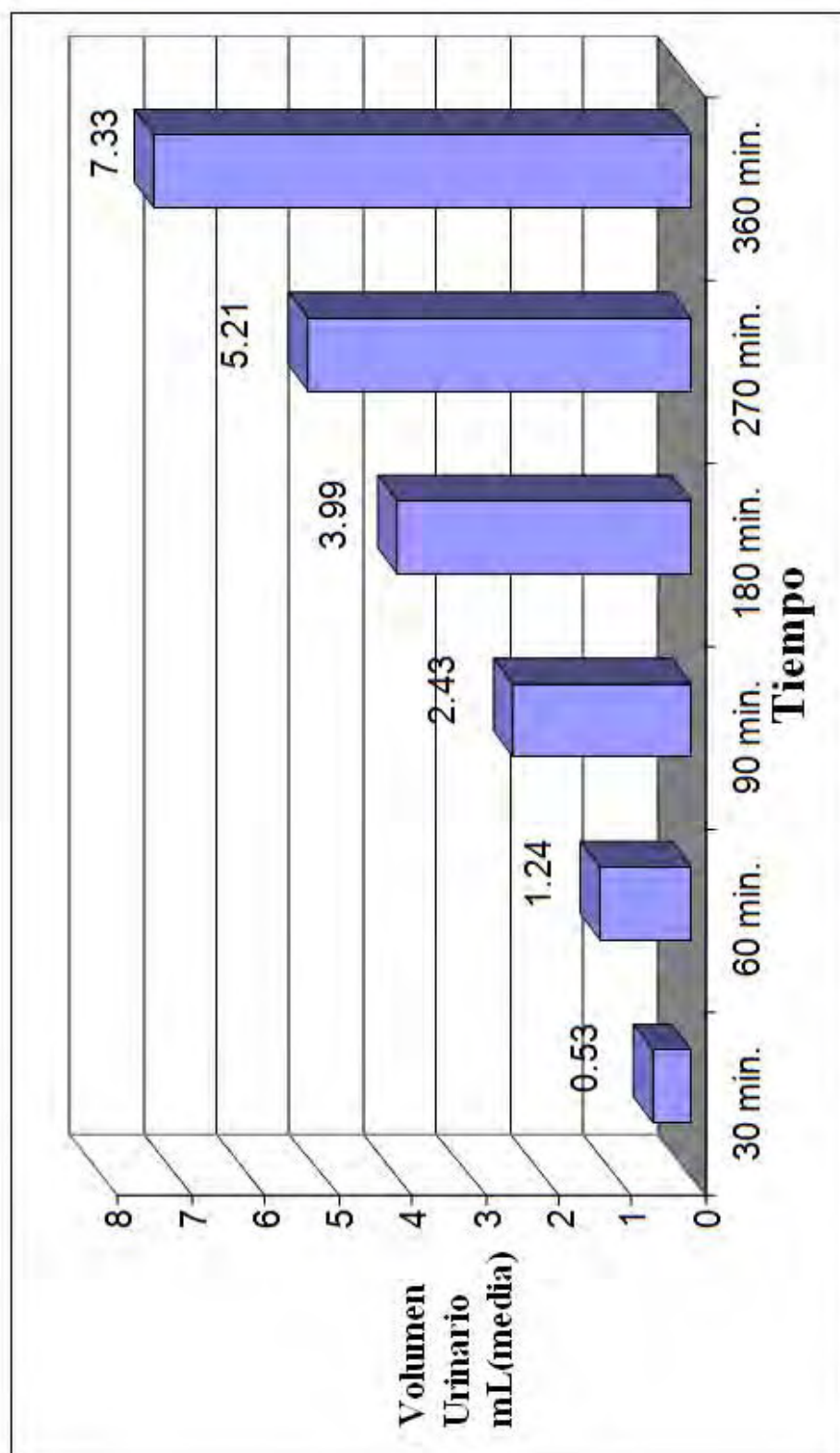


FIGURA N° 8. VOLUMEN URINARIO (mL) SEGÚN TIEMPO EN EL CONTROL POSITIVO HCT 25mg/Kg.

CUADRO N° 4. VOLUMEN URINARIO (mL) SEGÚN EL TIEMPO EN LA DOSIS 1 (180 mg/Kg)

ANOVA					Prueba de Tukey						
Volumen Urinario											
	N	mL (media)	Desviación típica	F	P	30 min.	60 min.	90 min.	180 min.	270 min.	360 min.
30 min.	8	0.41	0.10				*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
60 min.	8	0.84	0.09			*P<0.05		*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
90 min.	8	1.54	0.18	653	0.001*	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
180 min.	8	1.83	0.07			*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05		*P>0.05	*P<0.05
270 min.	8	2.59	0.24			*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
360 min.	8	4.01	0.10			*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05

*P<0.05 existe diferencias significativas; *P>0.05 no existe diferencias significativas.

A medida que transcurre el tiempo, el volumen urinario se incrementa significativamente P < 0.05 al administrarse el control positivo Furosemda 10 mg/Kg.

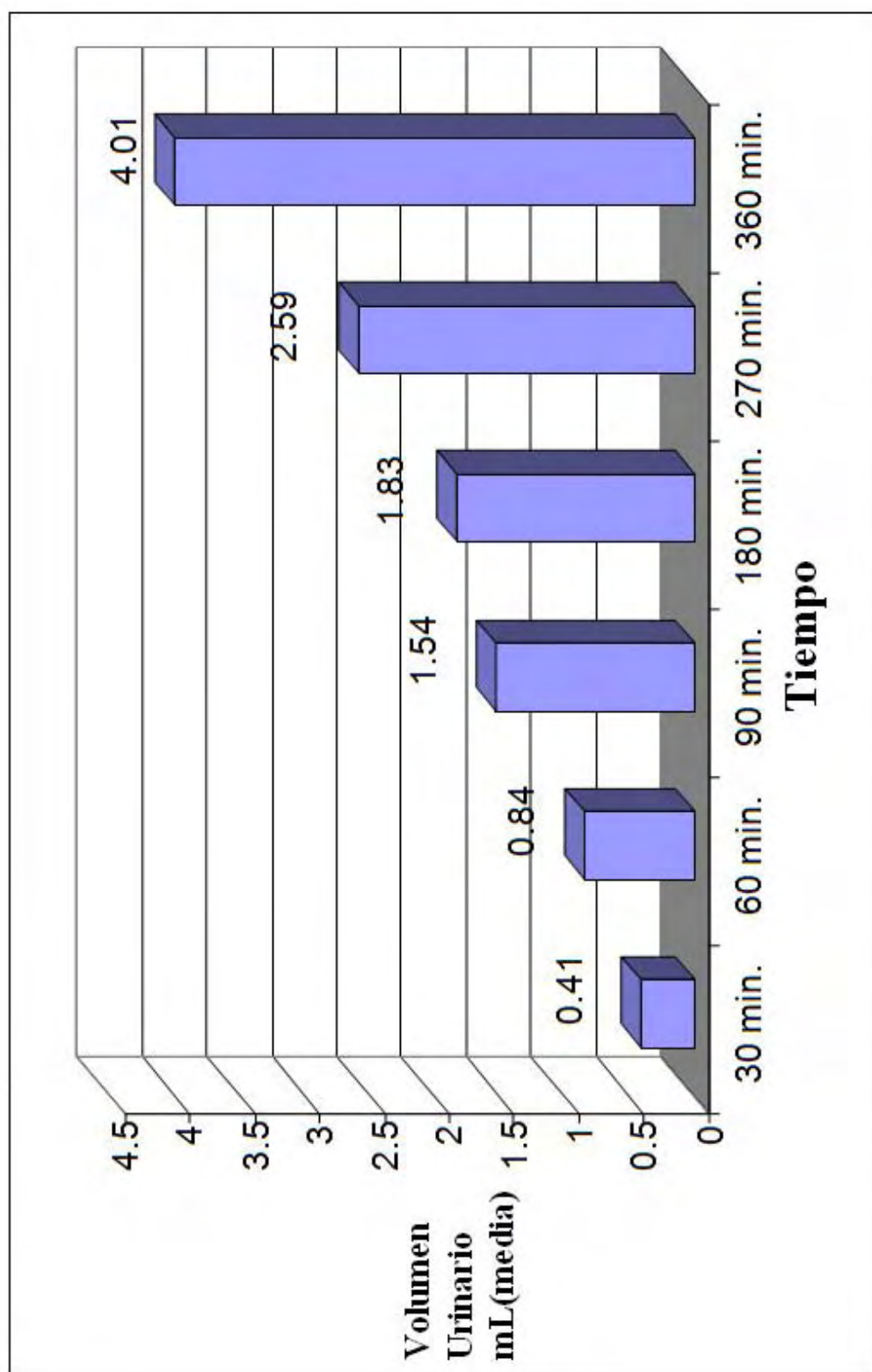


FIGURA N°9.VOLUMEN URINARIO (mL) SEGÚN EL TIEMPO EN LA DOSIS 1 (180 mg/Kg)

CUADRO N° 5. VOLUMEN URINARIO (mL) SEGÚN EL TIEMPO EN LA DOSIS 2 (540 mg/Kg)

ANOVA				Prueba de Tukey								
Volumen Urinario mL												
		Desviación típica		F	P	30 min.	60 min.	90 min.	180 min.	270 min.	360 min.	
N	(Media)											
8	0.60	0.18					*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	
8	1.48	0.13				*P<0.05		*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	
8	2.78	0.09		634	0.001*	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	
8	3.61	0.26				*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P>0.05	*P<0.05	
8	4.13	0.17				*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P>0.05	*P>0.05	
8	4.33	0.13				*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P>0.05	*P>0.05	

*P<0.05, existe diferencias significativas; *P<0.05, no existe diferencias significativas.

A medida que transcurre el tiempo el volumen urinario se incrementa significativamente (P < 0.05), al administrase la Dosis 2-540 mg/Kg

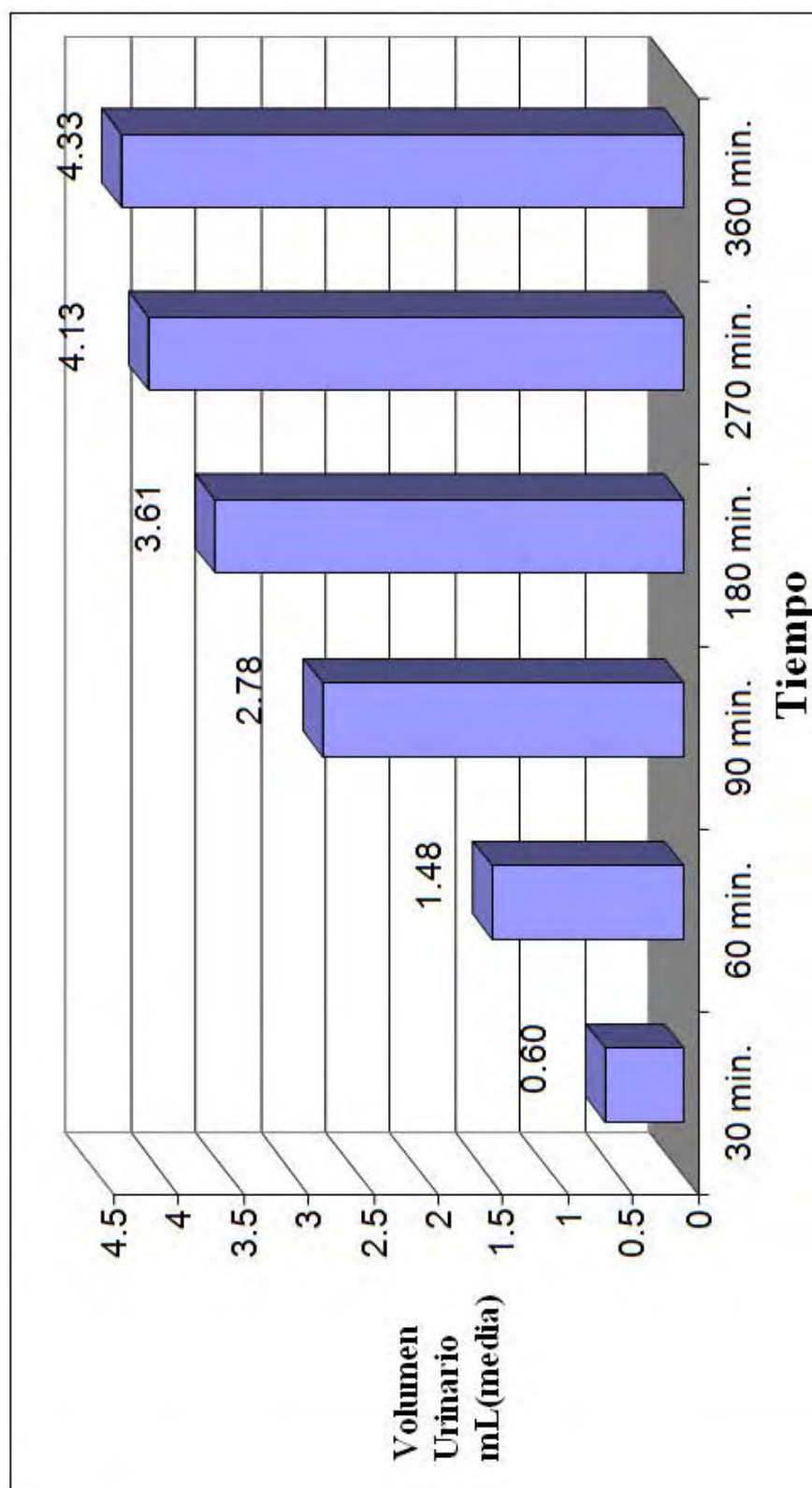


FIGURA N° 10 . VOLUMEN URINARIO (mL) SEGÚN EL TIEMPO EN LA DOSIS 2 (540 mg/Kg)

CUADRO N° 6. VOLUMEN URINARIO (mL) SEGÚN EL TIEMPO EN LA DOSIS 3 (900 mg/Kg)

ANOVA										Prueba de Tukey				
Volumen Urinario mL														
	N	(media)	Desviación típica	F	P	30 min.	60 min.	90 min.	180 min.	270 min.	360 min.			
30 min.	8	0.66	0.11				*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05			
60 min.	8	1.55	0.09			*P<0.05		*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05			
90 min.	8	3.38	0.28	544	0.001*	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05			
180 min.	8	3.78	0.28			*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P>0.05	*P<0.05			
270 min.	8	4.36	0.23			*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05			
360 min.	8	4.81	0.08			*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05			

*P<0.05 existe diferencias significativas; *P>0.05 no existe diferencias significativas.

A medida que transcurre el tiempo el volumen urinario se incrementa significativamente (P < 0.05) al administrarse la dosis 3-900 mg/Kg.

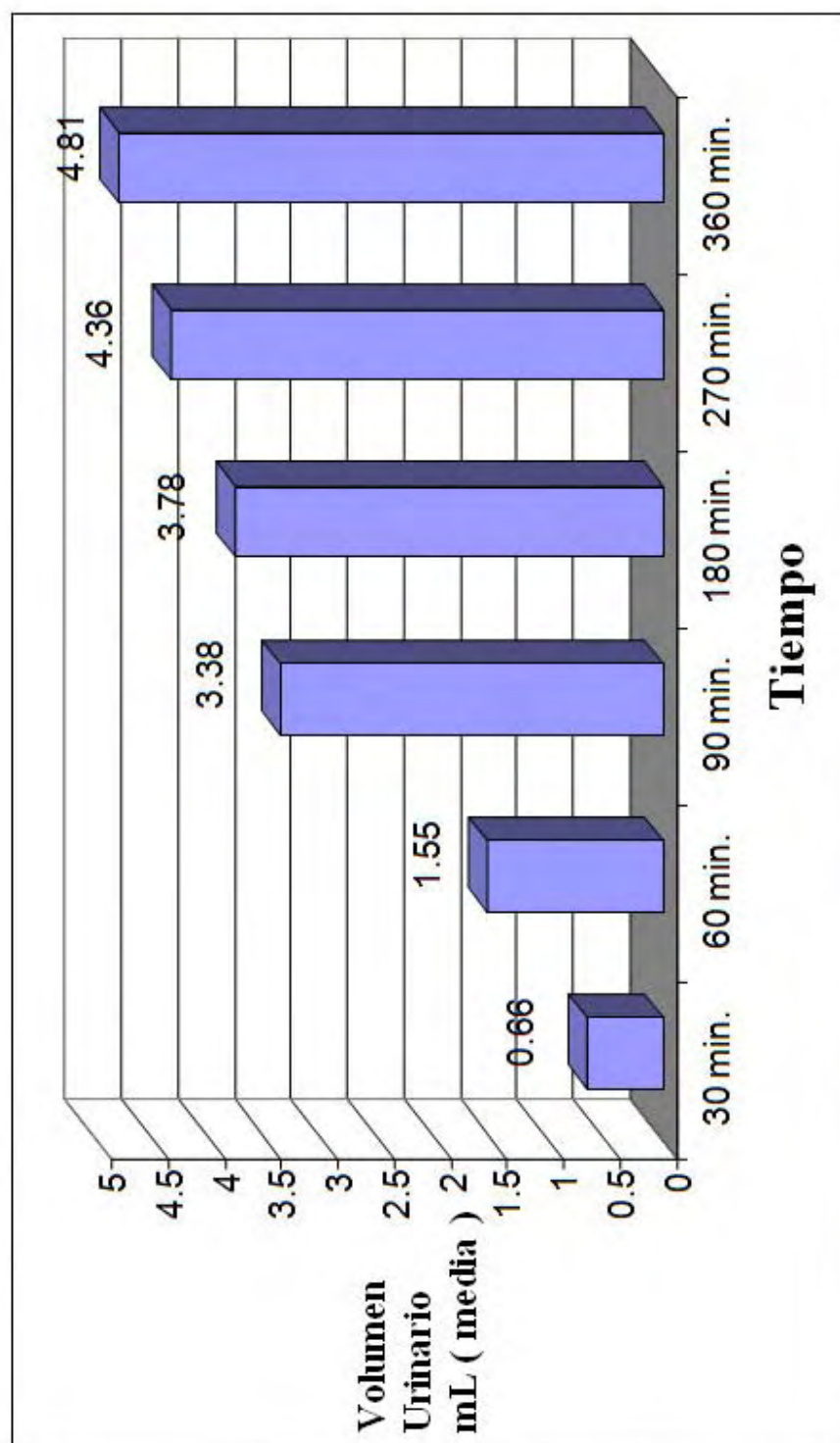


FIGURA N° 11. VOLUMEN URINARIO (mL) SEGÚN EL TIEMPO EN LA DOSIS 3 (900 mg/Kg)

CUADRO N°7 . VOLUMEN URINARIO (mL) SEGÚN COMPUESTOS ADMINISTRADOS AL FINALIZAR LAS 6 HORAS

			Anova		Prueba de Tukey					
Volumen Urinario			F	P	Control Negativo		Control Positivo		Dosis 1	
N	(Media)	Desviación típica			NaCl 0.9 %	10 mg/Kg	Furosemida HCT 25	mg/Kg	mg/Kg	Dosis 2
										Dosis 3
										mg/Kg
Control Negativo-NaCl 0.9%	48	3.8	1.22							900
Control Positivo- Furosemida 10 mg/Kg	48	4.78	1.23							
Control Positivo HCT 25 mg/Kg	48	7.33	2.40	375.88	0.001*					
Dosis 1 180 mg/Kg	48	4.01	1.20							
Dosis 2 540 mg/Kg	48	4.33	1.40							
Dosis 3 900 mg/Kg	48	4.81	1.52							

*P < 0.05 existe diferencias significativas; *P > 0.05 no existe diferencias significativas.

Se observa que el volumen de orina en el control negativo-NaCl 0.9% es menor significativamente (P<0.05) que el control Positivo-Furosemida 10 mg/Kg ,el control positivo-HCT 25 mg/Kg, la dosis 2-540 mg/Kg, Dosis 3-900 mg/Kg . El volumen de orina del Control Positivo-Furosemida 10 mg/Kg es mayor que la dosis 1-180 mg/Kg(P<0.05) . El volumen de orina del Control Positivo HCT-25 mg/Kg es mayor que la Dosis 1-180 mg/Kg (P<0.05) . La Dosis 3-900 mg/Kg es menor que Dosis 1-180 mg/Kg.

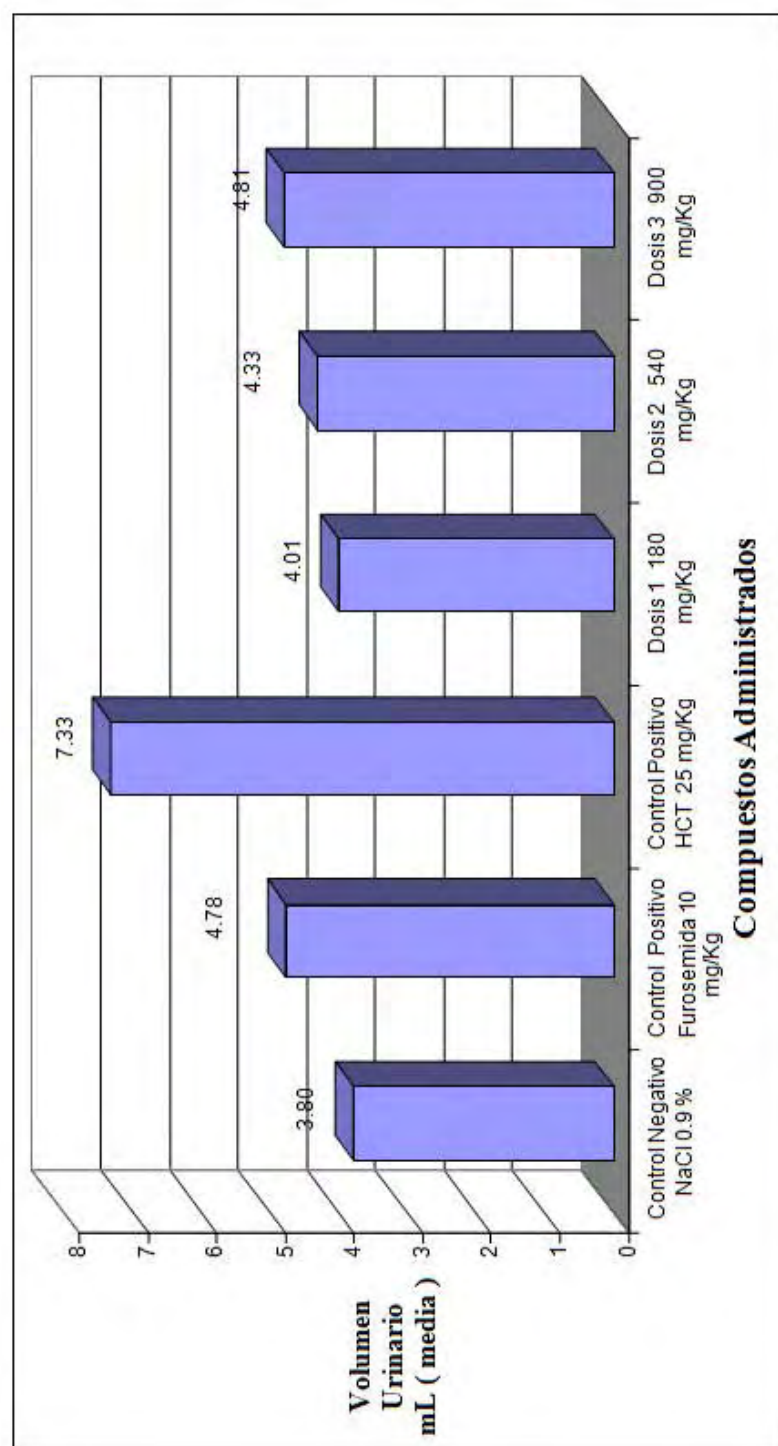


FIGURA N°12 .VOLUMEN URINARIO (mL) SEGUN COMPUESTOS ADMINISTRADOS AL FINALIZAR LAS 6 HORAS

CUADRO N° 8 . pH URINARIO A LAS 6 HORAS SEGÚN COMPUESTOS ADMINISTRADOS

		Anova		Prueba de Tukey					
		N	pH Urinario (media)	Desviación típica	F	P	Control		
							Control Negativo NaCl 0.9 %	Control Positivo Furosemida 10 mg/Kg	Control Positivo HCT 25 mg/Kg
							Dosis 1 180 mg/Kg	Dosis 2 540 mg/Kg	Dosis 3 900 mg/Kg
Control Negativo NaCl 0.9 %	8	7.10	0.02				*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
Control Positivo Furosemida 10 mg/Kg	8	7.50	0.02						
Control Positivo HCT 25 mg/Kg	8	7.36	0.03	721	0.001*		*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
Dosis 1 180 mg/Kg	8	7.45	0.04				*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
Dosis 2 540 mg/Kg	8	7.60	0.01				*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
Dosis 3 900 mg/Kg	8	7.79	0.02				*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05

*p<0.05 existe diferencias significativas ; *p>0.05 no existe diferencias significativas .

La media de la Dosis 3 - 900 mg/Kg es mayor significativamente(P<0.05) seguida por la Dosis 2-540 mg/Kg , a su vez etas es mayor que la Dosis 1-180 mg/Kg , le sigue el Control Positivo. Furosemida 10 mg/Kg , y finalmente con el Control Negativo NaCl 0.9 % .

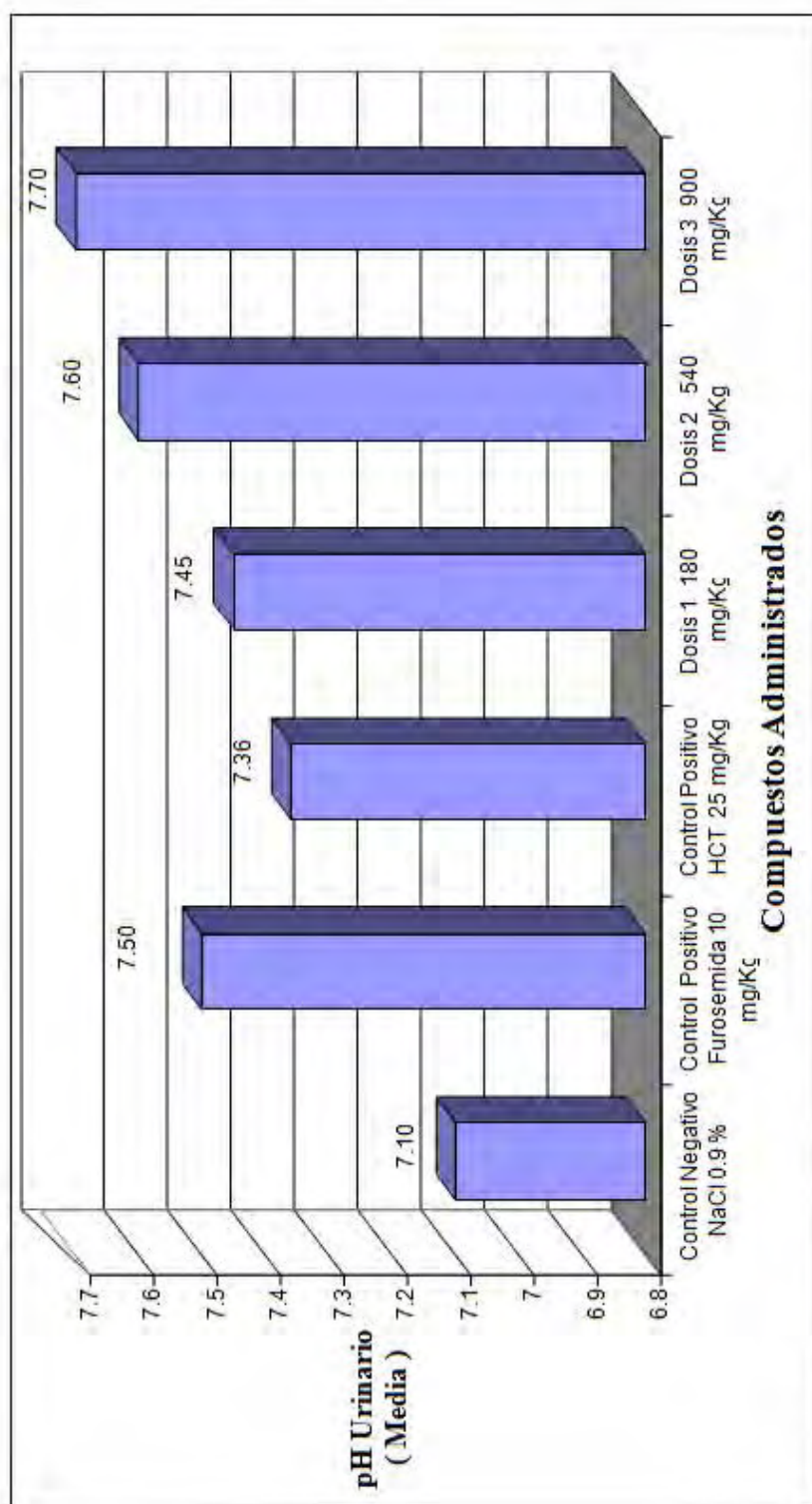


FIGURA N°13 . pH URINARIO A LAS 6 HORAS SEGÚN COMPUESTOS ADMINISTRADOS

CUADRO N° 9 . SODIO URINARIO A LAS 6 HORAS SEGÚN COMPUESTOS ADMINISTRADOS

		Anova		Prueba de Tukey							
		Na+ Urinario meq/L	Desviación típica	F	P	Control Negativo NaCl 0.9 %	Control Positivo Furosemina 10 mg/Kg	Control Positivo HCT 25	Dosis 1 180 mg/Kg	Dosis 2 540 mg/Kg	Dosis 3 900 mg/Kg
Control Negativo NaCl 0.9 %	8	46.97	2.10				*p<0.05	*p<0.05	*p>0.05	*p<0.05	*p<0.05
Control Pos. Furosemina 10 mg/Kg	8	78.81	0.82			*p<0.05			*p<0.05	*p<0.05	*p<0.05
Control Positivo HCT 25 mg/Kg	8	93.72	1.61	1317	0.001*	*p<0.05	*p<0.05		*p<0.05	*p<0.05	*p<0.05
Dosis 1 180 mg/Kg	8	48.56	1.26				*p<0.05	*p<0.05		*p<0.05	*p<0.05
Dosis 2 540 mg/Kg	8	58.89	0.94			*p<0.05	*p<0.05	*p<0.05	*p<0.05		*p<0.05
Dosis 3 900 mg/Kg	8	68.19	1.37			*p<0.05	*p<0.05	*p<0.05	*p<0.05	*p<0.05	

*p<0.05 existe diferencias significativas ; *p>0.05 no existe diferencias significativas .

El Control Positivo HCT 25 mg/Kg es mayor significativamente (P < 0.05); seguido por Control Positivo Furosemina 10 mg/Kg seguido por la Dosis 3-900 mg/Kg .No se encontró diferencias significativas entre Control Negativo NaCl 0.9 % y la Dosis 1-180 mg/Kg .

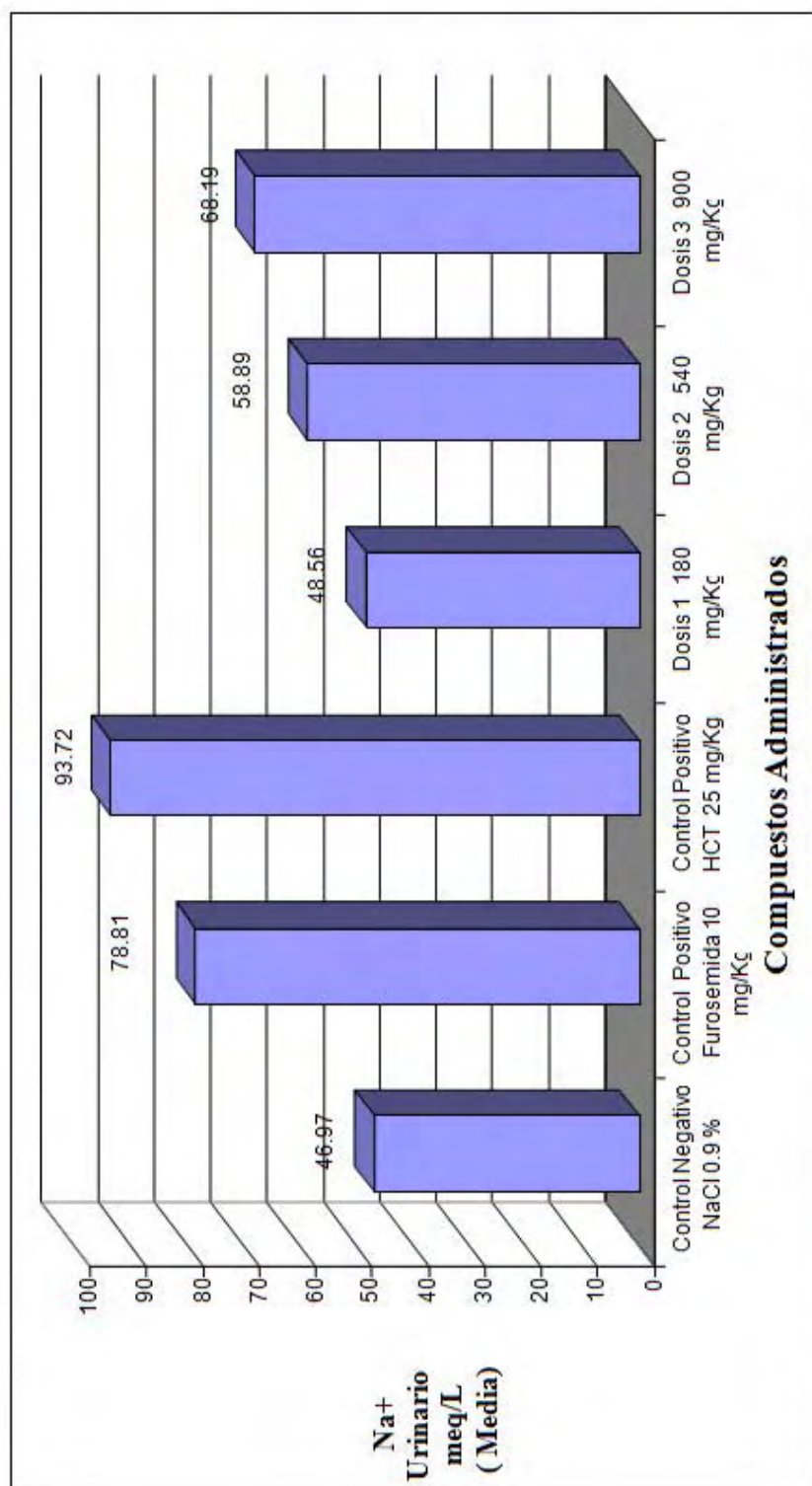


FIGURA N° 14 . SODIO URINARIO ALAS 6 HORAS SEGÚN COMPUESTOS ADMINISTRADOS

CUADRO N° 10. POTASIO URINARIO A LAS 6 HORAS SEGÚN COMPUESTOS ADMINISTRADOS

		Anova		Prueba de Tukey								
K+ Urinario meq/L	N	Desviación típica	F	P	Control		Control		Dosis 1 180 mg/Kg	Dosis 2 540 mg/Kg	Dosis 3 900 mg/Kg	
					Negativo NaCl 0.9 %	Positivo Furosemida 10 mg/Kg	Positivo HCT 25 mg/Kg	Positivo Furosemida 10 mg/Kg				
Control Negativo NaCl 0.9 %												
	8	21.78	1.03			*P<0.05		*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	
Control Positivo												
Furosemida 10 mg/Kg	8	47.79	0.67									
Control Positivo HCT 25 mg/Kg												
	8	60.76	1.74	773	0.001*	*P<0.05		*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	
Dosis 1 180 mg/Kg	8	24.38	2.12			*P<0.05		*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	
Dosis 2 540 mg/Kg	8	37.19	2.04			*P<0.05		*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	
Dosis 3 900 mg/Kg	8	48.13	0.99			*P<0.05		*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	

*P<0.05 existe diferencias significativas ; *P<0.05 no existe diferencias significativas .

Se encontró que el Control Positivo HCT 25 mg/Kg es mayor (P<0.05) que Dosis 3-900 mg/Kg y este es mayor que el Control Positivo (P<0.05) Furosemida 10 mg/Kg y este es mayor que la Dosis 2-540 mg/Kg (P<0.05) y este mayor que Dosis 1-180 mg/Kg y mayor que Control Negativo – NaCl 0.9 % (P<0.05) .

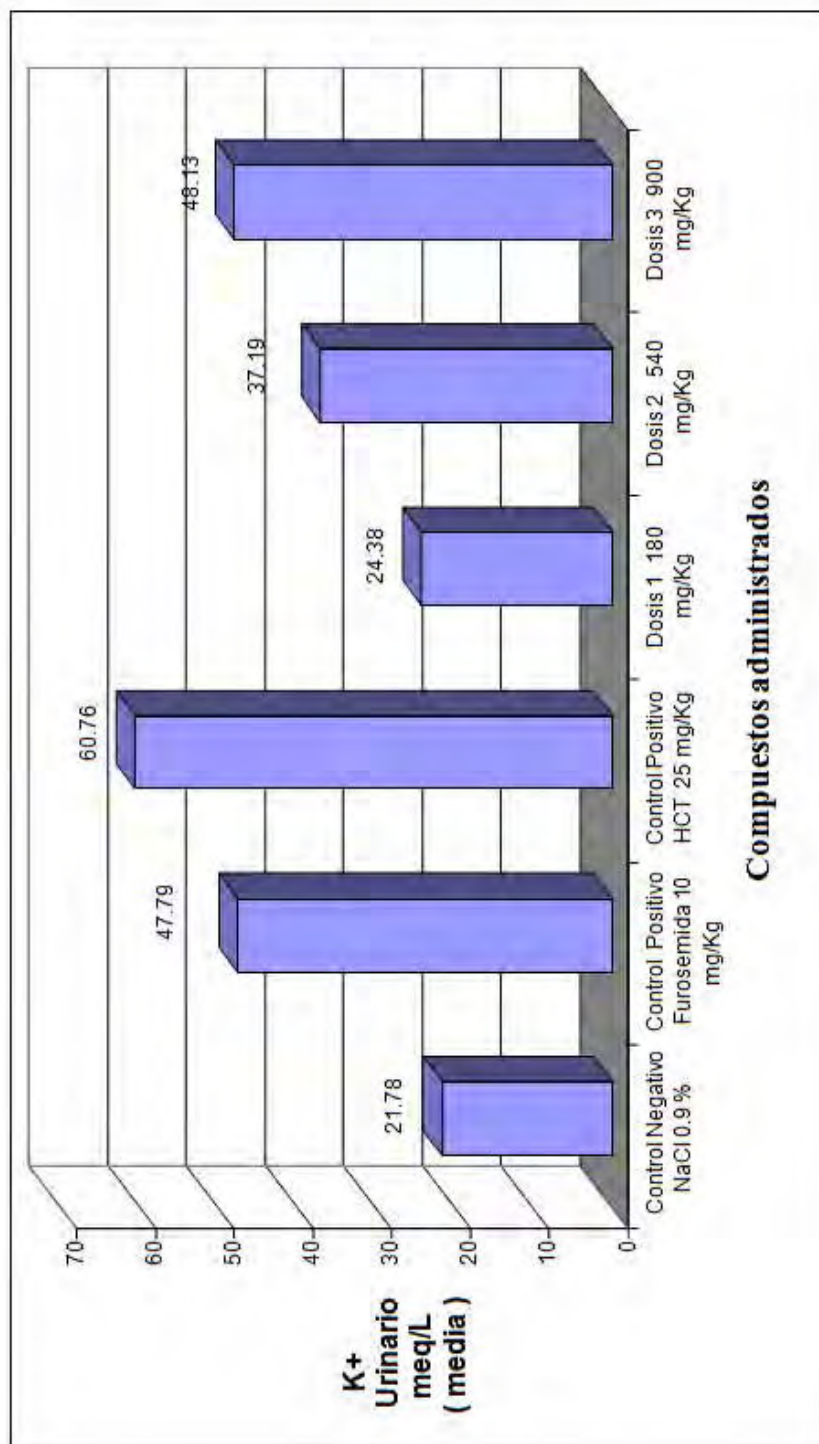


FIGURA N°15 . POTASIO URINARIO ALAS 6 HORAS SEGÚN COMPUESTOS ADMINISTRADOS

CUADRO N° 11 . CLORURO URINARIO A LAS 6 HORAS SEGÚN COMPUESTOS ADMINISTRADOS

				Anova		Prueba de Tukey					
	N	Cl- Urinario meq/L (Media)	Desviación típica	F	P	Control					
						Control Negativo NaCl 0.9 %	Control Positivo Furosemida 10 mg/Kg	Control Positivo HCT 25 mg/Kg	Dosis 1 180 mg/Kg	Dosis 2 540 mg/Kg	Dosis 3 900 mg/Kg
Control Negativo- NaCl 0.9 %	48	78.05	0.80				*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05		*P<0.05
Control Positivo- Furosemida 10 mg/Kg	48	91.42	0.90			*P<0.05		*P>0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
Control Positivo- HCT 25 mg/Kg	48	104.77	1.65	773	0.001*	*P<0.05	*P<0.05		*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
Dosis 1-180 mg/Kg	48	78.83	1.06				*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05
Dosis 2-540 mg/Kg	48	88.96	0.80			*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05		*P<0.05
Dosis 3- 900 mg/Kg	48	97.13	1.74			*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	*P<0.05	

*P<0.05 existe diferencias significativas ; ***P>0.05** existe diferencias significativas .

El Control Positivo HCT 25 mg/Kg es mayor significativamente ; seguido por Control Positivo. Furosemida 10 mg/Kg seguido por la Dosis 3- 900 mg/Kg ($P < 0.05$) .No se encontró diferencias significativas entre Control Negativo-NaCl 0.9 % y Dosis 1-180 mg/Kg .

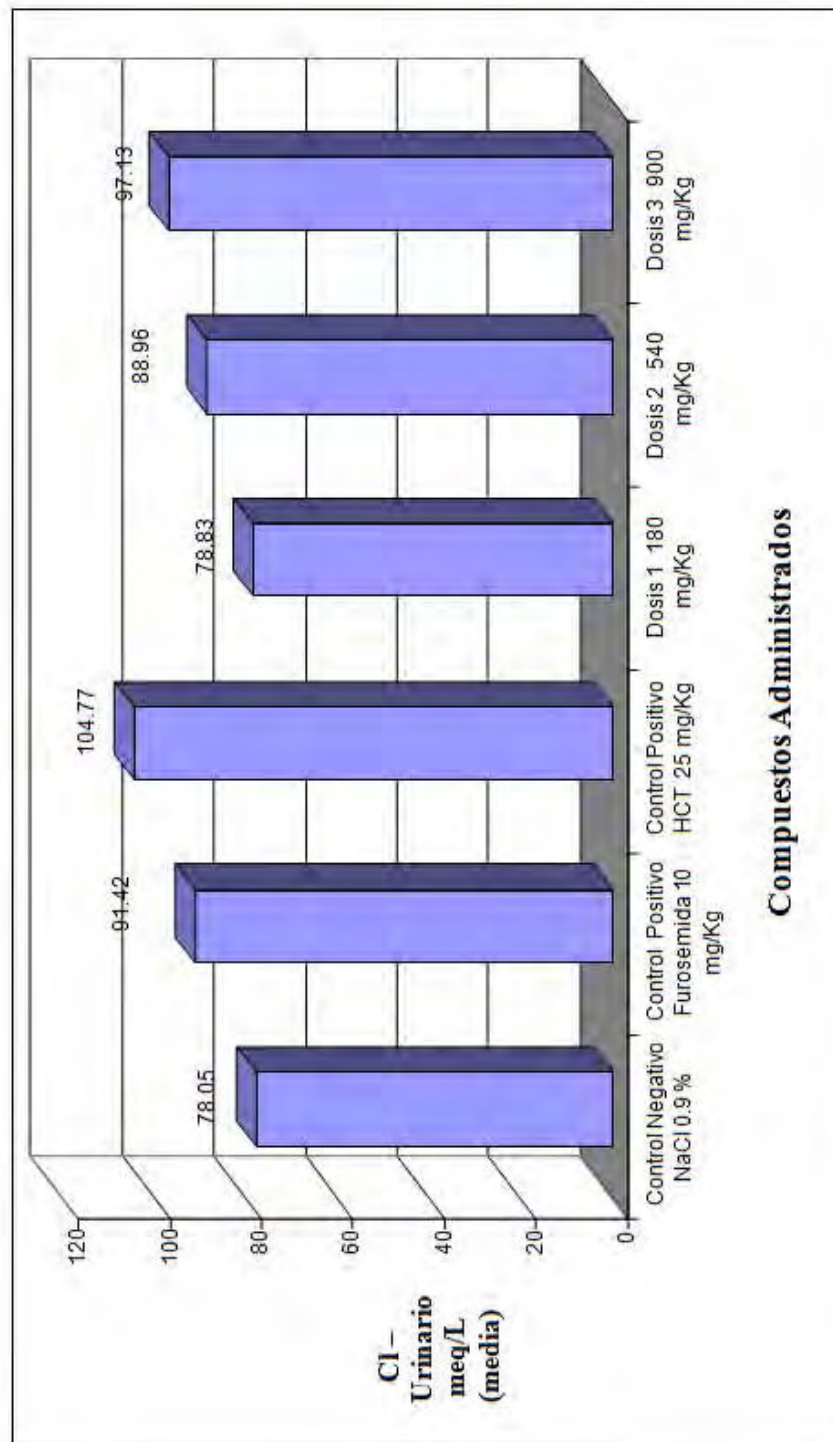


FIGURA N° 16 . CLORURO URINARIO A LAS 6 HORAS SEGUN COMPUESTOS ADMINISTRADOS

**CUADRO N°12 .VOLUMEN PROMEDIO ACUMULADO DE ORINA EN 6 HORAS Y CONCENTRACIÓN DE ELECTROLITOS
PARA LOS GRUPOS CONTROL NEGATIVO Y TRATADOS CON ZUMO LIOFILIZADO DEL *Citrus limon L.*.**

	ORINA mL (media)	SODIO meq/L (media)	POTASIO meq/L (media)	CLORURO meq/L (media)
Control Negativo – NaCl 0.9 %	3.8	46.97 a	21.78	78.05 b
Dosis 1 180 mg/Kg	4.01	48.56 a	24.38	78.83 b
Dosis 2 540 mg/Kg	4.33	58.89	37.19	88.96
Dosis 3 900 mg/Kg	4.81	68.19	48.13	97.13

*Valores con la misma letra son iguales estadísticamente (*P > 0.05) .

CUADRO N° 13. VOLUMEN PROMEDIO ACUMULADO URINARIO EN 6 HORAS Y CONCENTRACIÓN DE ELECTROLITOS LUEGO DE ADMINISTRAR EL ZUMO LIOFILIZADO DEL *Citrus limon L.*, A 3 CONCENTRACIONES DIFERENTES Y DE DIURÉTICOS DE REFERENCIA FUROSEMIDA (10mg/Kg) Y HCT (25mg/Kg) * .

	ORINA mL (media)	SODIO meq/L (media)	POTASIO meq/L (media)	CLORURO meq/L (media)
Control Pos. Furosemida 10 mg/Kg	4.78	78.81	47.79	91.42
Control Positivo HCT 25 mg/Kg	7.33	93.72	60.76	104.77
Dosis 1 180 mg/Kg	4.01	48.56	24.38	78.83
Dosis 2 540 mg/Kg	4.33	58.89	37.19	88.96
Dosis 3 900 mg/Kg	4.81	68.19	48.13	97.13

Se aprecia que la orina y electrolitos se relacionan así : Control Positivo-HCT 25 mg/Kg > Dosis 3 900 mg/Kg > Control Positivo-Furosemida 10 mg/Kg > Dosis 2-540 mg/Kg > Dosis 1-180 mg/Kg (P < 0.05).

CUADRO N° 14 . PROMEDIO DEL pH URINARIO EN 6 HORAS Y RELACION NA⁺/K⁺ LUEGO DE ADMINISTRAR EL ZUMO LIOFILIZADO DEL *Citrus limon L.* , A 3 CONCENTRACIONES DIFERENTES Y DEL DIURÉTICOS DE REFERENCIA FUROSEMIDA (10mg/Kg) Y HCT (25mg/Kg) * .

Tratamiento	pH	Na ⁺ /K ⁺
Zumo Liofilizado (180 mg/Kg)	7.45	1.99
Zumo Liofilizado (540 mg/Kg)	7.60	1.58
Zumo Liofilizado (900 mg/Kg)	7.79	1.42
Furosemida (10 mg/Kg)	7.50	1.65
HCT (25 mg/Kg)	7.36	1.54
Control Negativo - NaCl 0.9 %	7.10	2.15

* Valores expresados en media . Significación estadística frente al control (*P < 0,05)

CUADRO N° 15 . EXCRECIÓN URINARIA , ACCIÓN Y ACTIVIDAD DIURÉTICA DESPUÉS DE 6 HORAS DE ADMINISTRACIÓN DEL ZUMO LIOFILIZADO DEL *Citrus limon L.*, Y DIURÉTICOS DE REFERENCIA *.

	Excreción Urinaria (%)	Acción Diurética	Actividad Diurética ¹
Control Negativo-NaCl 0.9 %	76 ^a	1	
Control Positivo-Furosemida 10 mg/Kg	91.05 ^b	2.40	
Control Positivo HCT 25 mg/Kg	146.60	3.86	
Dosis 1 180 mg/Kg	72.91 ^a	1.92	0.80
Dosis 2 540 mg/Kg	80.48	2.12	0.55
Dosis 3 900 mg/Kg	93.76 ^b	2.47	1.29

¹ Se tomo la dosis de 10 mg/kg de Furosemida para el cálculo.

Valores con la misma letra son iguales estadísticamente ($P > 0.05$).

CUADRO N° 16. PORCENTAJE DE REDUCCION DEL PESO DEL ZUMO DEL *Citrus limon* L. POR EL LIOFILIZADO

g de fruto de limón	ml de zumo liquido de limón	g de zumo liquido	g de zumo lioofilizado	Porcentaje de liquido deshidratado a partir del peso inicial
100	37.5	38.74	3.87	90%

CUADRO N°17. EQUIVALENCIA DE DOSIS ADMINISTRADA EN RATAS VERSUS INGESTA HUMANA (PARA UNA PERSONA DE 70 Kg)

Dosis (Ratas)		Ingesta (humana)			
mg de zumo Liofilizado/ Kg de peso	Frutos del Limón	ml de zumo liquido	gramos de zumo liquido	gramos de zumo lioofilizado	mg. de zumo lioofilizado/ Kg de peso
180	1	12,1	12,5	1.26	18
540	3	36,2	37,5	3.75	54
900	5	60,4	62,5	6.27	90

5.2 ESTUDIO TOXICOLÓGICO

5.2.1.TOXICIDAD ORAL AGUDA

La dosis letal media del zumo liofilizado del Limón (*Citrus limon L.*) se encuentra sobre los 2,000 mg/kg administrados por vía oral en ratas de experimentación . Se observó que los animales no murieron a ese nivel de dosis, por lo que su clasificación toxicológica es de categoría 5 . A partir de los 30 minutos hasta las 4 horas posteriores a la administración del zumo liofilizado, se observaron signos clínicos como : ligero incremento de la frecuencia respiratoria, disminución de la apertura palpebral y pasividad, Posterior a las 4 horas no se observó ningún otro signo .El estudio histopatológico se realizo en el laboratorio de Histopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Alas Peruanas , concluyendo mayoritariamente en escasa anormalidad aparente a nivel microscópico en los diferentes órganos enviados para tal fin (hígado y riñón) .

CUADRO N° 18 . PESO PROMEDIO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN LA FASE INICIAL . INTERMEDIA Y FINAL DEL ESTUDIO TOXICOLÓGICO (DL 50).

	N	Peso Corporal (media)	Desviación típica	P
Peso Inicial	6	225.14	5.84	
Peso al día 07	6	230.00	6.16	0.09*
Peso al día 14	6	232.86	6.91	

***P>0.05** No significativo .

No se encontró diferencias significativas entre los pesos (*** P > 0.05**)

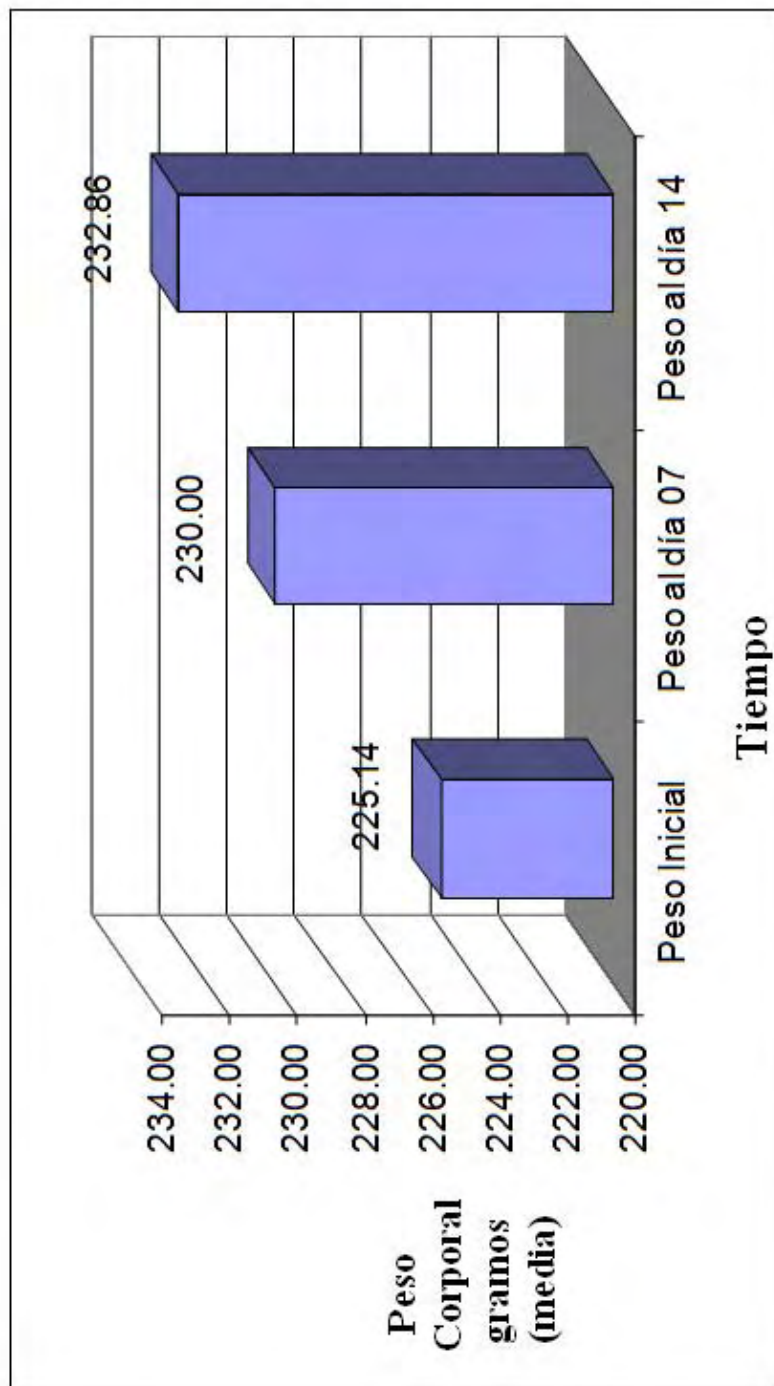


FIGURA N° 17 . PESO PROMEDIO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN LA FASE INICIAL. INTERMEDIA Y FINAL DEL ESTUDIO TOXICOLOGICO (DL 50).

5.2.2. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

- **HÍGADO (40X :400)**

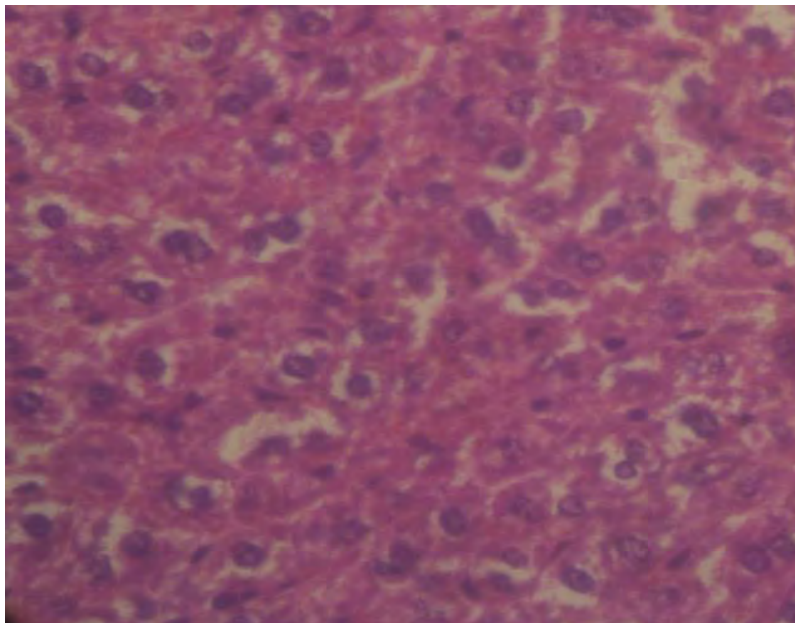


Figura N° 18 .

FOTOGRAFÍA DE CORTE HISTOLÓGICO DE HÍGADO DE RATA SIN TRATAMIENTO (BLANCO) . TINCIÓN : HEMATOXILINA Y EOSINA (H.E.)

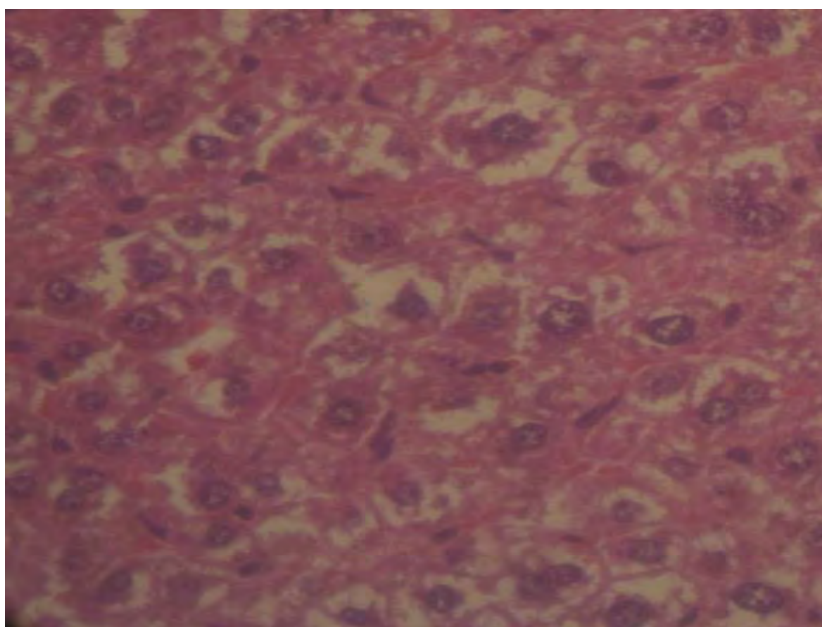


Figura N° 19

FOTOGRAFÍA DE CORTE HISTOLÓGICO DE HÍGADO DE RATA TRATADO CON EL ZUMO, OBSERVÁNDOSE DEGENERACIÓN HIDRÓPICA: HEPATOCITOS VOLUMINOSOS DE CITOPLASMA PÁLIDO, ALGUNOS HEPATOCITOS EXPERIMENTAN DEGENERACIÓN BALONIZANTE (2B). TINCIÓN HE.

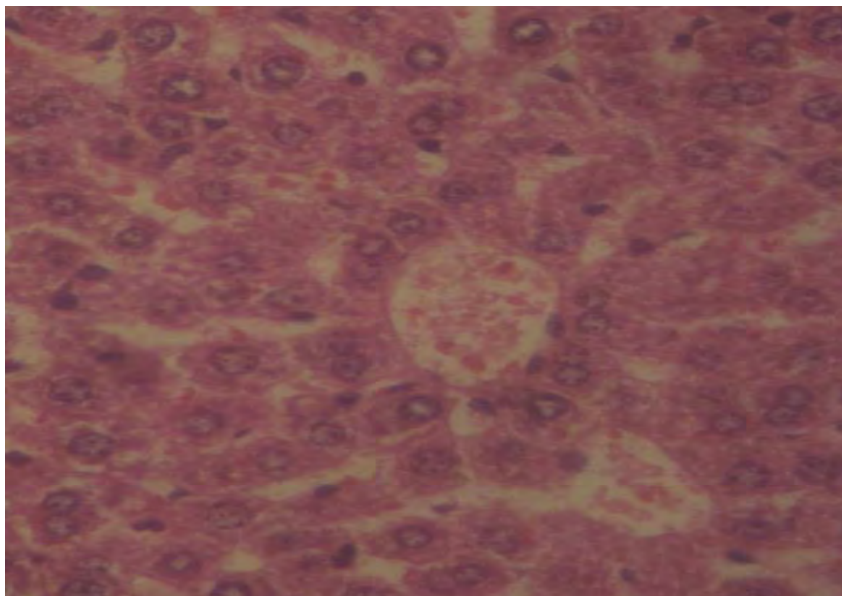


Figura N° 20

FOTOGRAFÍA DE CORTE HISTOLÓGICO DE HÍGADO DE RATA TRATADO CON ZUMO. SIMILARES CARACTERÍSTICAS MENCIONADAS EN LA FIGURA N° 5 MUESTRA UNA VENA CENTROLUBULILLAR, DONDE SE OBSERVA UNA DISTRIBUCIÓN TIPO DIFUSA. (2B) TINCIÓN : HE .

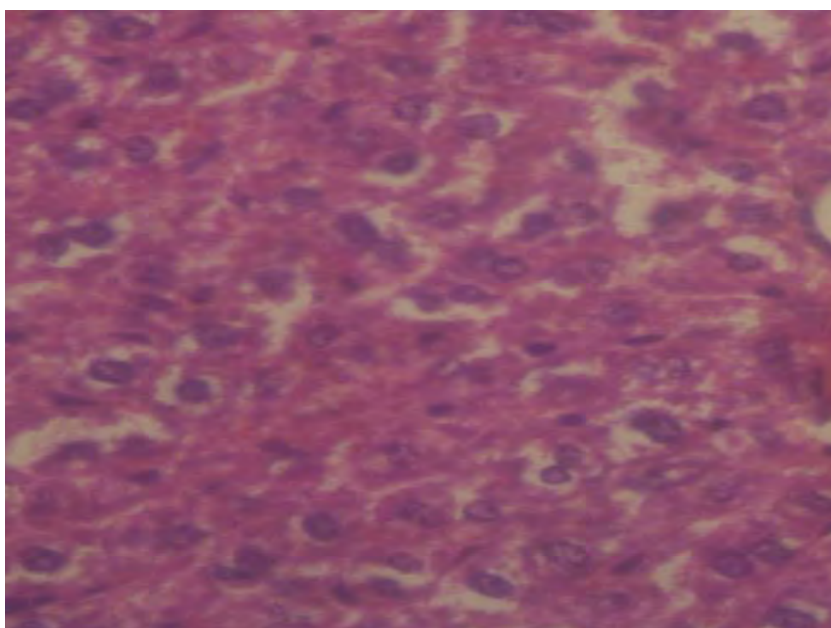


Figura N° 21

FOTOGRAFÍA DE CORTE HISTOLÓGICO DE HÍGADO DE RATA TRATADO CON EL ZUMO LIOFILIZADO , NO SE OBSERVAN CAMBIOS APARENTES (2C). TINCIÓN : HE.

- **RIÑÓN (40X : 400)**

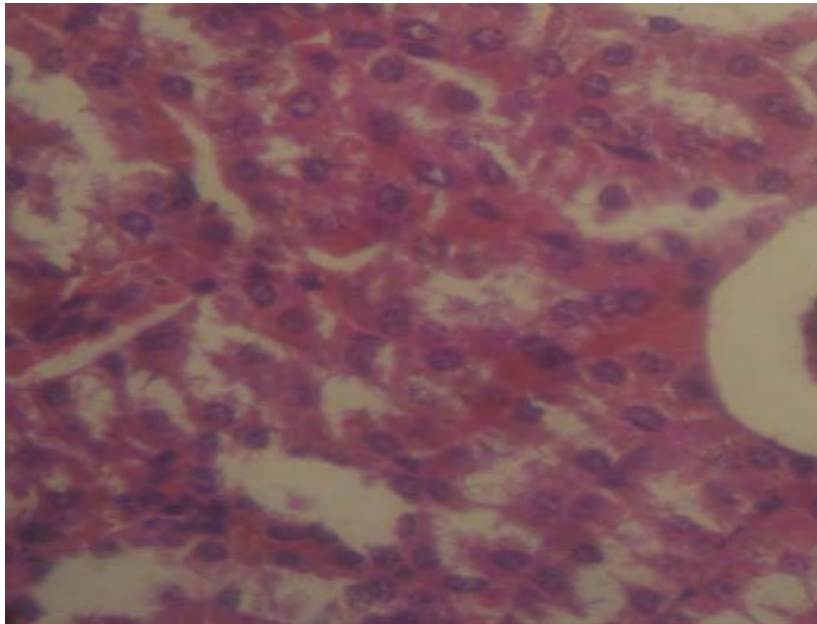


Figura N° 22

FOTOGRAFÍA DE CORTE HISTOLÓGICO DE RIÑÓN DE RATA SIN TRATAMIENTO (BLANCO) . TINCIÓN : HE .

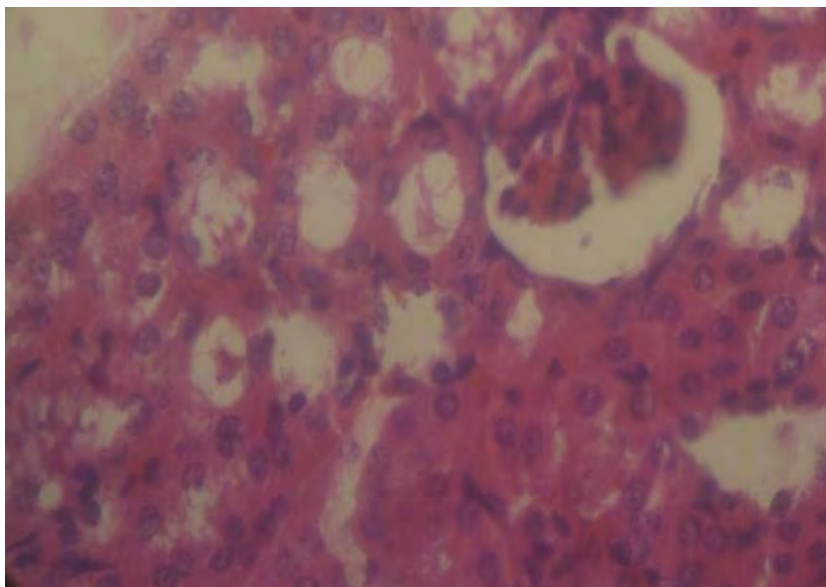


Figura N° 23

FOTOGRAFÍA DE CORTE HISTOLÓGICO DE RIÑÓN DE RATA, TRATADO CON EL ZUMO LIOFILIZADO, NO SE OBSERVAN CAMBIOS (2 B) . TINCION : HE.

VI. DISCUSIÓN

6.1. ESTUDIO FARMACOLÓGICO.

La especie estudiada fue seleccionada en base a las referencias de uso tradicional como diurética en zumo . Para el método de obtención y la vía de administración se tuvo en consideración el uso popular (1 a 9 limones) ⁽¹⁸⁾.

El porcentaje de reducción del peso del zumo del *Citrus limon L.* por el liofilizado fue de un 90%, que se contrasta afirmativamente con lo establecido por Turpo (1986), que indica que el rango de dicha reducción esta entre el 70 y 90% del peso inicial ⁽²³⁾ .

La administración de una carga hidrosalina (solución fisiológica) uniformiza y mejora la respuesta de la sustancia probada. ^(25,34,35,36). El exceso de agua y electrolitos simula una situación de edema ⁽²⁵⁾, razón por la cual en el presente trabajo se administró solución salina fisiológica a todos los animales de experimentación en el correspondiente estudio farmacológico.

Si se tiene en cuenta la equivalencia en gramos del fruto con respecto al zumo liofilizado para esta especie ensayada y si se considera la relación de dosis humano / rata como 1/10 (teniendo en cuenta la superficie corporal) ^(37) , la administración de 180, 540 y 900 mg de zumo liofilizado / Kg de peso de ratas exceden ampliamente el rango de 1 – 9 limones (Cuadro N° 17) usualmente utilizado en el consumo humano (18 - 180mg de zumo liofilizado /Kg de peso) ⁽¹⁵⁾ .

La dosis de 180 , dosis 540 y dosis 900 mg/Kg de zumo liofilizado mostraron un efecto diurético significativo en comparación con el grupo control de solución fisiológica (NaCl 0.9 %) (Cuadros N° 7, 12 y 13) . La Furosemida ocasiono un efecto diurético marcado comparado con el *Citrus limon L.*, de significación estadística en la segunda y tercera hora de la recolección de orina. La Furosemida es un diurético de asa que ha sido utilizado ampliamente en este modelo de diuresis , incluidos varios estudios con especies vegetales ^(37, 38) . El inicio de acción del efecto diurético del *Citrus limon L.*, es ligeramente retardado con respecto a la Furosemida y la Hidroclorotiazida , lo que puede obedecer a factores farmacocinéticas o

farmacodinámicos de los principios activos del zumo del fruto. Los efectos en la diuresis de *Citrus limon L.*, en las dosis de 180, 540 y 900 mg/kg de peso corporal se diferenciaron ligeramente ($P < 0.05$). No obstante, la administración del zumo del fruto produjo un aumento en la excreción de sodio, potasio y cloruro . Los efectos en la excreción de electrolitos podrían ser mediados por la concentración de potasio del fruto, debido a que se observó así mismo una tendencia al incremento en la concentración de sodio urinario con dosis mas altas de *Citrus limon L.*($P < 0.05$), (Cuadros N°12 y 13). Lo anteriormente indicado se explica debido a que las concentraciones tubulares altas de potasio estimulan la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa en la membrana basolateral de las células del epitelio tubular, disminuyendo la concentración de sodio en la orina ^(39) , que se observó al administrar la dosis 3 del zumo del limón (900mg/Kg) en comparación a la Furosemida . Además el potasio altera el gradiente de voltaje transepitelial, favoreciendo la reabsorción de sodio ^(40, 41) . Los datos de diuresis y excreción de electrolitos obtenidos en este trabajo de investigación, no son similares a los reportados con las Tiazidas que actúan en el túbulo distal ⁽⁴²⁾ .

Los diuréticos incrementan el volumen urinario y la eliminación de electrolitos por lo que se utilizan para regular tanto el volumen como la composición del medio interno en diferentes afecciones como la hipertensión, insuficiencia cardiaca y síndromes nefróticos, entre otros. La Furosemida incrementa notablemente la saluresis, especialmente la excreción de Na^+ y Cl^- motivo de su elección para este estudio como uno de los controles positivos. El efecto diurético del zumo liofilizado del *Citrus limon L.*, quedo demostrado al existir una respuesta diurética positiva en las dosis ensayadas : 180, 540, 900 mg/Kg comparadas con el grupo control negativo y con la Furosemida . Se demostró que el zumo liofilizado de 900mg/Kg produjo significativamente un mayor volumen de orina en 6 horas comparable al de la Furosemida ($P < 0.05$) (Cuadro N ° 7). Las dosis del zumo liofilizado de 180 y 540 mg/Kg mostraron un incremento de volumen menor al obtenido por la de 900 mg/Kg pero significativamente mayor a la dosis de control negativo ($P < 0.05$) (Cuadro N° 7).

La excreción de sodio en los grupos tratados con zumo del fruto liofilizado y Furosemida , no se comportó igual a la eliminación del volumen . Cuando se compara el control se aprecia que eliminó cantidades menores de este ion. Es evidente el hecho de que este grupo, al ser tratado con cloruro de sodio 0.9 % eliminó un porcentaje de orina menor . Al comparar la dosis de 900 mg/Kg de zumo del fruto con la Furosemida se aprecia que es menor la concentración del ion sodio aunque la diuresis sea todo lo

contrario. Al analizar el comportamiento del potasio se puede observar que las concentraciones obtenidas con el zumo del fruto estudiado son superiores al control e incluso a la Furosemida, diurético conocido como expoliador de potasio. Esto pudiera estar relacionado con el contenido del mismo presente en la mayoría de las especies vegetales. Se sumaría entonces al efecto diurético propio de la planta la cantidad de potasio que porta dicho vegetal. Un aspecto importante demostrado en esta investigación es el comportamiento de la planta similar en el tiempo al diurético de referencia donde se observó un pico máximo de excreción a la quinta hora. De igual forma se reporta en la literatura que la Furosemida tiene una acción relativamente breve en el organismo, aproximadamente de 4-6 horas ⁽⁴³⁾, que se hace evidente cuando a la sexta hora, la diuresis disminuyó considerablemente en ambos grupos. Es de destacar que a medida que se incrementaron los niveles de dosis del zumo liofilizado del fruto del limón, el volumen eliminado también fue superior, así como la excreción de electrolitos, resultado que hablan a favor de una posible respuesta dependiente de la dosis.

Se analizó la relación Na^+/K^+ observándose su incremento para el zumo liofilizado en orden descendente dependiendo de la dosis frente a la relación del control. El cociente Na^+/K^+ para la Hidroclorotiazida fue mayor que el de la Furosemida, La relación Na^+/K^+ para el zumo liofilizado a dosis de 180mg/Kg fue mayor que el de la Furosemida. Se conoce que el cociente Na^+/K^+ serviría como indicador para comparar el efecto de los diferentes diuréticos, así en la Furosemida (diurético de elevada eficacia) tiene un valor de aproximadamente igual a 1, debido a la alta eliminación de ambos iones en orina. Para las Tiazidas este cociente es menor de 1, ya que aumenta la concentración urinaria de potasio, alterando la relación Na^+/K^+ . En el caso de los ahorradores de potasio el cociente es mayor que 1 ya que las concentraciones de ese ion en orina se encuentran disminuidos ⁽³⁴⁾. Sin embargo en otros estudios, para la Hidroclorotiazida, la relación Na^+/K^+ se ha encontrado en 3.62 ⁽²⁵⁾ y para la Furosemida 2.51 ⁽⁴⁾ y en el actual ensayo se obtuvieron 1.54 y 1.65 respectivamente. Para el zumo liofilizado la relación Na^+/K^+ vario de 1.99 (180 mg/Kg) a 1.42 (900 mg/Kg). Semejante a lo descrito por Ratnasooriya y otros ⁽²⁷⁾, las concentraciones de Na^+ y K^+ se incrementaron sin alteración marcada de su cociente, lo que descarta un mecanismo tipo tiazidas. Los diuréticos de asa, inhibidores del cotransporte de $Na^+/K^+/Cl^-$, incrementan la natriuresis y kaliuresis ⁽³⁾, respuesta que se aproxima a este ensayo (Cuadro N° 14).

De las tres concentraciones del zumo liofilizado, la de 900 mg/Kg , mostró el mejor efecto diurético, que pudiera estar asociados con el contenido de flavonoides del fruto de esta planta, así mismo promueven altos niveles de Na^+ y K^+ en la orina. Hay correspondencia entre el volumen de orina y la concentración de Na^+ , este aspecto es lógico porque los mecanismos de acción de un gran número de fármacos diuréticos es decrecer la reabsorción de este ión, esto produce el arrastre del equivalente osmótico del agua, otra explicación que puede explicar esto, es la alta concentración de iones en las plantas medicinales ⁽⁴⁴⁾ . Todas las concentraciones de los zumos liofilizados produjeron altas concentraciones de K^+ en la orina , siendo de las tres la más poderosa excretora de K^+ la de 900 mg/Kg .

La relación Na^+/K^+ del zumo liofilizado de 180mg/Kg , fue mayor al de la Furosemida, posiblemente debido al contenido de K^+ del zumo liofilizado administrado , más no lo fue con las otras dosis del zumo liofilizado (540 y 900 mg/Kg) , lo cual tendría que ser contrastado con los electrolitos plasmáticos de los animales de experimentación (estudio que no fue posible realizar en el presente trabajo) , lo cual sería importante a fin de poder afirmar que la respuesta diurética no es el resultado de un efecto salino, sino que representa una actividad intrínseca (Cuadro N° 14) .

El valor corregido de excreción urinaria sirve para igualar los tratamientos de zumo liofilizado de 180 mg/Kg, 540 mg/Kg y 900 mg/Kg con los controles positivos, que pueden ser diferentes al compararlos sobre la base de volumen de orina. Nedi y otros ⁽²⁵⁾ mostraron valores de excreción urinaria para *C. edulis* (dosis 1,000 mg/Kg) , de 80.6 % , superior a la del zumo del limón de 180mg/Kg . La acción diurética para el *C. edulis* fue 1.1 – 2.2; similar al del presente estudio. La actividad diurética para el *C. edulis* fue 0.4 – 0.6 ⁽²⁵⁾ , inferior al fármaco utilizado aquí como diurético de referencia , la furosemida . Para su validez se debe corregir los resultados de volumen urinario, y además comparar volúmenes a tiempos diferentes(Cuadro N° 15) .

La actividad diurética del zumo liofilizado, menos variable , al compararla con la acción diurética con un diurético conocido, fue ligeramente mayor a la Furosemida . Un buen indicador de eficacia , permitiría clasificar el zumo liofilizado con efecto diurético , sin embargo, depende del diurético de referencia utilizado ^(25, 44, 45 y 46) .

El pH urinario se alcalinizó ligeramente ,a medida que se incrementaron los tratamientos con el zumo de limón y resulto ser estadísticamente significativo al compararlos con los controles negativos y positivos, que corresponden con la literatura reportada, que indica que el limón es una fruta con propiedades alcalinizantes de la orina por lo que resulta ideal para evitar la formación de cálculos renales (Cuadro N° 14) ^(16, 47 y 48) .

Por el valor estimulante de la Cafeína o el mismo Ácido Ascórbico, puede utilizarse como diurético en tratamientos de obesidad, al aumentar la micción, eliminando líquido corporal. (jugo de limón)⁽¹⁶⁾ . Si se ingirieren más de 600 miligramos por día, el ácido ascórbico posee un leve efecto diurético. Dosis altas (más de dos gramos al día) pueden provocar diarreas. Con dosis diarias superiores a los cuatro gramos aumenta el riesgo de formación de cálculos renales ⁽⁴⁹⁾ . La Diosmina un citrobioflavonoide es indicado en el alivio a corto plazo (2-3 meses) de edemas y síntomas relacionados con insuficiencia venosa crónica ⁽⁵⁰⁾ .En el zumo del fruto del limón, se encuentran varios compuestos químicos como el Ácido Ascórbico, Diosmina, entre otros, con actividad diurética, que pueden estar actuando en forma aislada o en sinergia (fitofármaco) , justificando así, entre otros supuestos, el efecto diurético observado en el presente estudio.

6.2. ESTUDIO TOXICOLÓGICO.

Los resultados toxicológicos demostraron la inocuidad del zumo liofilizado del *Citrus limon L.*, al no observarse signos clínicos que evidenciaran toxicidad y no produce mortalidad a la dosis de 5,000 mg/Kg . La variación del peso corporal en los animales de experimentación durante las 2 semanas , no fue estadísticamente significativa. Lo hallado en el presente trabajo corrobora con lo encontrado en la literatura revisada de que los constituyentes del zumo del fruto del limón al darse aisladamente como el Ácido Ascórbico, su dosis tóxica probable es 1-5 g y la DL50 por vía oral del Ácido Cítrico en ratas es de 6,730 mg/Kg ^(19) . De lo anteriormente señalado se desprende que sería necesaria una gran cantidad de frutos o zumos del fruto a fin de poder causar algún daño en una sola dosis a una persona adulta .

En el estudio histopatológico del hígado de rata se encontró en un animal degeneración hidrópica: hepatocitos voluminosos de citoplasma pálido, algunos

hepatocitos con degeneración balonizante (Figura N° 19), además de una vena centrolubulillar, donde se observa una distribución tipo difusa (Figura N° 20). No se encontraron alteraciones histopatológicas de hígado en los demás animales necropsiados.. Cabe mencionar que la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades del Hígado definió como criterios para el diagnóstico de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) en humanos la presencia de esteatosis en combinación con hepatocitos balonizados, así como de infiltrado inflamatorio mixto acompañado, en ocasiones, de fibrosis ⁽⁵¹⁾ . En el estudio histopatológico del riñón de rata no se encontraron alteraciones en todos los animales necropsiados

En el presente estudio no se puede inferir algún proceso patológico a nivel anatomo funcional , debido a que son necesarios estudios posteriores prolongados en el tiempo para realmente saber si existe algún riesgo en el consumo continuo del zumo de limón.

Como resultado de la evaluación toxicológica regulada por la OECD en su norma N° 423 correspondiente a la toxicidad oral aguda - método de las clases toxicas agudas ,el zumo liofilizado del fruto del *Citrus limon L.* , se clasifica en la categoría 5 o no clasificado (DL 50 : 5,000 mg/Kg de peso corporal) .

VII. CONCLUSIONES

Del estudio del efecto diurético del zumo del fruto del Limón (*Citrus limón L.*) en ratas de experimentación se desprenden las siguientes conclusiones :

- El zumo del fruto del Limón (*Citrus limon L.*), posee un efecto diurético y saluretico que se asemeja a la furosemida además de ser ligeramente alcalinizante urinario .
- El zumo del fruto del Limón (*Citrus limon L.*), es inocuo, clasificado como categoría 5 o inclasificable (DL50 : 5,000 mg/Kg) según lo establecido por la OECD en su norma N° 423.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Del Rio, S. Volemia y excreción urinaria en ratas hipertensas tratadas con Nifedipina o diuréticos . Rev. Cubana Invest. Biomed. 2001; 20(2): 99-103 .
2. Fores , R. Atlas de las plantas medicinales y curativas . Ediciones Cultural S.A. Madrid – España. 1997.
3. Kreydiyyeh SI, Julnar V. Diuretic effect and mechanism of action of Parsley . Ethnopharmacol, 2002 ; 79 : 303 – 57 .
4. Lahlou S, Tahroui A, Israili Z, Lyoussi B. Diuretic activity of aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats. J. Ethnopharmacol. 2007 ; 110 : 458 – 63 .
5. Godman Gilman, Alfred. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Volumen I, Editorial Mac Graw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. México, D.F. México, 2001.
6. Guyton , Arthur C. Tratado de Fisiología Medica. Editorial Mac Graw-Hill / Interamericana de España, S,A. Madrid, España. 2001.
7. Malgor, Luis Alberto; Valsecia, Mabel Elsa. Farmacología Medica. Sección III, Ediciones Donato/Farm. Buenos Aires, Argentina. 1999.
8. Lorenzo, P.; Moreno A.; Leza J.C.; Lizasoain et al. Velásquez-Farmacología Básica y Clínica. 17 ava. Edición. Editorial medica Panamericana. Madrid, España. 2004.
9. Contreras Santos, Freddy O, ; Blanco García, Mario R, Fisiopatología, Editorial McGraw-Hill Interamericana de Venezuela S,A, Caracas, Venezuela. 1997 .
10. Collins R, Mc Mahon S; Blood Pressure antihypertensive drugs treatment and the risks of stroke and coronary heart disease, Br, Med, Bull, 1994, 50 : 272.

11. Oparil Suzane, Calhoun David, III high blood pressure . Cardiovascular Medicine. June, 2000 ; 3 : 37.
12. Oparil S.; Antihypertensive therapy and atherosclerosis in coronary heart disease. Cardiovasc Risk Factors. 1996; 6: 222 .
13. García Barriga, Hernando. Flora Medicinal de Colombia. Tercer Mundo Editores. Bogota, Colombia. 1992.
14. Font Quer, P. Plantas Medicinales – El Dioscórides Renovado. Editorial labor S.A. Barcelona, España. 1981.
15. Brack Egg, Antonio . Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Centro de Estudios Regionales Andinos “Bartolomé de las Casas” . Cuzco, Perú. 1999.
- 16 .Zaka. Maquina de Pelar. Base de datos abierta. [Citado el 20 de Enero del 2005]. Disponible en <http://www.pelalimones.com/citricos/> .
17. Macavilca Cuellar, L M. Determinación de Vitaminas y Minerales en Variedades del Genero Citrus. Tesis para optar al titulo de Químico-Farmacéutico, Universidad Nacional Mayor de San Marcos . Lima ,Perú . 1971.
18. Gasbarra , M.; Villatoro, E M . Plantas de uso medicinal en Centro América. OPS/OMS. Guatemala, 2000.
19. Duke, J. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. [Citado el 20 de Enero del 2005].Disponible en : <http://www.ars-grin.gov/duke/>.
20. Wikipedia. Enciclopedia virtual en Internet. [Citado el 30 de Enero del 2005]. Disponible en : <http://en.wikipedia.org/wiki/>.
21. Harrison Jack, Farmacognosia I y II .Universidad Nacional Mayor de San Marcos . Lima, Perú . 1984 .

22. Municipalidad Distrital de Chilca. Historia de Chilca. [Citado el 10 de Enero del 2005]. Disponible en : <http://www.scribd.com/doc/4002859/Historia-de-Chilca-principal1> .
23. Turpo Suarez , Julia C, Estudio Químico Bromatológico del Apio (*Apium Graveolens*..) liofilizado y fresco , Tesis para optar al título de Químico-Farmacéutico, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 1986.
24. CYTED. Manual of investigations techniques. Project X 1. Search of active principles in plants of the region. Subprogram X: Fine Pharmaceutical Chemistry. Iberoamerican Science and Technology Programme for Development. CYTED ed. 1995.
25. Nedi T; Mekonnen N; Urga K , Diuretic effect of the crude extracts of *Carissa edulis* in rats, *Ethnopharmacol*, 2004; 95 : 57 – 61 .
26. Jimenez Nieves, Lesly y Colaboradores . Efecto diurético del *Xanthium strumarium* L. (Guizado de Caballo). *Rev. Cubana Plant Med* . 1999 ; 1 (4) . 22 – 5 .
27. Caceres, A . Plantas de uso medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. Guatemala. 1996.
28. Harris , D.C. Análisis Químico Cuantitativo, 2ª ed, Editorial Reverté, Barcelona – España. 2001.
29. Venkatesh Iyengar , G, Element análisis of biological samples : Principles and practices, CRC Press, New York, E.U.A. 1998.
30. Wiener Lab Group . Vademécum de kits reactivos . [Citado el 17 de Enero del 2005]. Disponible en : <http://www.wiener-lab.com.ar/sp/index.html> .
31. OECD. Guidelines for testing of Chemicals N° 423 . Acute Toxic Class Method .2001. [Citado el 08 de Enero del 2005]. Disponible en : <http://oberon.sourceoecd.org/vl=1549295/cl=18/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s24/p1> .

32. Repetto , M. Toxicología Fundamental. Ediciones Díaz de Santos, S.A. España . 1997 .
33. Betancourt Badell , J. Cuestiones Éticas en la Experimentación Animal. DOC., 1999.
34. Ratnasooriya WD, Pieris KPP, Samaratunga U, Jayakody JRAC, Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats, J Ethnopharmacol, 2004; 91:317-20 .
35. Benjumea D, Abdala S, Hernandez-Luis F, Perez-Paz P, Martin-Herrera D. Diuretic activity of *Artemisia thuscula*, an endemic canary species. J. Ethnopharmacol. 2005; 100:205-9 .
36. Leon, M.C.; Tillán, J. Diuretic effect and acute toxicity of *Orthosiphon aristatus* Blume (kidney tea). Rev Cub Plant Med 1996; 1(3):30-6.
37. Camargo ME, Berdeja B, Miranda G. Diuretic effect of the aqueous extract of *Bidens odorata* in the rat. J,Ethnopharmacol 2004; 95 : 363 – 6 .
38. Maghrani M, Zeggwagh NA, Haloui M, Eddouks M. Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats . J Ethnopharmacol 2005; 99 : 31-5 .
39. Feraille E, Doucet A, Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney : hormonal control, Physiol Rev 2001; 81: 345-418 .
40. Burg MB, Tubular chloride transport and the mode of action of some diuretics,.Kidney Int, 1976 ; 9 : 189-97 .
41. Schlueter W, Keilani T, Hizon M, Kaplan B, Batlle DC, On mechanism of impaired distal acidification in hyperkalemic renal tubular acidosis : evaluation with amiloride and bumetanide. J Am Soc Nephrol 1992; 3 : 953 – 64 .
42. Masereeuw R, Moons WM, Russel FG, Saturable accumulation and diuretic activity of hydrochlorothiazide in isolated perfused rat kidney. Pharmacology 1997; 54: 33 – 42.

43. Bowman WC, Rand MJ. Farmacología. Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas. 2 ed. T.2. Editorial Científico-Técnica . La Habana - Cuba, 1987.
44. Sripanidkulchai B, Wongpanich V. Diuretic effects of selected Thai indigenous medicinal plants in rats. J Ethnopharmacol 2001; 75(2-3):185-190.
45. Dussol B, Moussi-Frances J, Morange S, Somma-Delpero C, Mundler O, Berland YA. Randomized trial of furosemide vs hydrochlorothiazide in patients with chronic renal failure and hypertension. Nephrol Dial Transplant 2005; 20(2):349- 53.
46. Basu SK, Arivukkarasu R. Acute toxicity and diuretic studies of aerial *Rungi repens* parts in rats. Fitoterapia 2006; 77(2):83-5.
47. Maksimovic Z, Dobric S, Kovacevic N, Milovanovic Z. Diuretic activity of *Maydis stigma* extract in rats. Pharmazie 2004; 59(12):967-7.
48. Jiménez L, Leon MC, Herrera R, Garcías G, Cardinal L. Diuretic effect of the *Xanthium strumarium* L (guisazo de caballo). Rev Cub Plant Med 1999; 1(4): 22-5.
49. Vitabasix. LHP Inc. Pharmatrans. [Citado el 11 de diciembre del 2004]. Disponible en : http://www.vitabasix.com/index.php/page/p152_es_vitamina-c-info.html.
50. Rodrigo JA. Guía de manejo de la insuficiencia venosa crónica. Guías Clínicas 2002; 2(21); 1-4.
51. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell S. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single Topic Conference. Hepatol 2003, 37: 1202-19.

IX. ANEXOS

CUADRO N°19

VOLUMEN URINARIO REPETIDO ACUMULADO DE ORINA DURANTE 6 HORAS DEL CONTROL NEGATIVO (NaCl 0.9 %)

Volumen Urinario en mL						
Tiempo	30 min.	60 min.	90 min.	180 min.	270 min.	360 min.
Control Negativo NaCl 0.9 %						
Repetición 1	0,35	0,5	0,8	1,5	1,9	3,7
Repetición 2	0,4	0,6	0,9	2,2	2,4	3,8
Repetición 3	0,4	0,8	0,95	1,1	1,8	3,8
Repetición 4	0,2	0,3	0,8	2	2,6	3,9
Repetición 5	0,5	0,7	0,85	1,7	2,5	3,8
Repetición 6	0,6	0,85	0,9	1,2	3	3,7
Repetición 7	0,45	0,55	0,8	1,3	2,5	3,8
Repetición 8	0,5	0,5	0,9	1,6	2,7	3,9

CUADRO N°20

VOLUMEN URINARIO REPETIDO ACUMULADO DE ORINA DURANTE 6 HORAS DEL CONTROL POSITIVO FUROSEMIDA (10 mg/Kg)

Volumen Urinario en mL						
Tiempo	30min.	60min.	90min.	180min.	270min.	360min.
Control Positivo Furosemida 10 mg/Kg						
Repetición 1	0,9	2,4	3,5	3,9	4,2	4,7
Repetición 2	1	2,7	3,4	3,7	3,9	4,6
Repetición 3	1,2	2,5	3,8	4,1	4,1	4,8
Repetición 4	0,9	2,9	3,7	3,8	3,9	4,8
Repetición 5	0,8	2,9	3,3	3,8	3,9	4,7
Repetición 6	0,9	2,8	3,3	3,9	3,9	4,9
Repetición 7	1,1	2,5	3,5	3,7	3,9	4,95
Repetición 8	1	2,3	3,5	3,65	3,8	4,8

CUADRO N°21
VOLUMEN URINARIO REPETIDO ACUMULADO DE ORINA DURANTE 6
HORAS DEL CONTROL POSITIVO HIDROCLOROTIAZIDA (25 mg/Kg)

Volumen Urinario en mL						
Tiempo	30min.	60min.	90min.	180min.	270min.	360min.
Control Positivo Hidroclorotiazida(HCT) 25 mg/Kg						
Repetición 1	0,5	0,9	1,5	3,8	4,5	6,9
Repetición 2	0,6	1,4	1,7	4	4,9	7
Repetición 3	0,3	1	2	3,9	5	7,5
Repetición 4	0,7	1,2	2,4	3,5	6	6,85
Repetición 5	0,45	1,1	3	3,6	5,4	7,3
Repetición 6	0,35	1,2	2,8	4	5,3	7,8
Repetición 7	0,55	15	2,9	4,3	5,2	7,9
Repetición 8	0,8	1,6	3,1	4,8	5,4	7,35

CUADRO N°22
VOLUMEN URINARIO REPETIDO ACUMULADO DE ORINA DURANTE 6
HORAS DE LA DOSIS 1 (180 mg/Kg)

Volumen Urinario en mL						
Tiempo	30min.	60min.	90min.	180min.	270min.	360min.
Dosis 1 180 mg/Kg						
Repetición 1	0,4	0,8	1,2	1,9	2,5	4
Repetición 2	0,6	0,7	1,7	1,8	2,3	3,95
Repetición 3	0,4	0,9	1,5	1,9	2,5	3,9
Repetición 4	0,3	0,8	1,7	1,8	2,9	4,2
Repetición 5	0,3	0,9	1,6	1,7	2,4	3,9
Repetición 6	0,4	0,85	1,4	1,8	2,8	4
Repetición 7	0,4	0,8	1,5	1,9	2,4	4
Repetición 8	0,5	1	1,7	1,8	2,9	4,1

CUADRO N°23
VOLUMEN URINARIO REPETIDO ACUMULADO DE ORINA DURANTE 6
HORAS DE LA DOSIS 2 (540 mg/Kg)

Volumen Urinario en mL						
Tiempo	30min.	60min.	90min.	180min.	270min.	360min.
Dosis 2 540 mg/Kg						
Repetición 1	0,5	1,4	2,8	3,1	4,1	4,3
Repetición 2	0,7	1,5	2,7	3,5	4,3	4,4
Repetición 3	0,3	1,4	2,65	3,7	4,4	4,5
Repetición 4	0,6	1,3	2,9	3,9	4,1	4,4
Repetición 5	0,6	1,4	2,8	3,7	4	4,1
Repetición 6	0,7	1,6	2,7	3,8	3,9	4,2
Repetición 7	0,9	1,5	2,9	3,4	4	4,45
Repetición 8	0,5	1,7	2,8	3,8	4,2	4,3

CUADRO N°24
VOLUMEN URINARIO REPETIDO ACUMULADO DE ORINA DURANTE 6
HORAS DE LA DOSIS 3 (900mg/Kg)

Volumen Urinario en mL						
Tiempo	30min.	60min.	90min.	180min.	270min.	360min.
Dosis 3 900 mg/Kg						
Repetición 1	0,6	1,6	3,3	3,8	4,3	4,7
Repetición 2	0,6	1,7	3,1	3,9	4,1	4,8
Repetición 3	0,5	1,6	3,3	3,5	4,3	4,8
Repetición 4	0,6	1,5	3,1	3,4	4,7	4,9
Repetición 5	0,7	1,6	3,6	3,7	4,2	4,9
Repetición 6	0,7	1,4	3,5	3,6	4,15	4,8
Repetición 7	0,8	1,5	3,9	4,1	4,7	4,7
Repetición 8	0,8	1,5	3,2	4,2	4,4	4,85

CUADRO N°25

pH URINARIO REPETIDO ACUMULADO DE ORINA DURANTE 6 HORAS DEL
CONTROL NEGATIVO (NaCl 0.9 %)

pH Urinario Control Negativo	
CINa 0.9 %	pH
Repetición 1	7,08
Repetición 2	7,1
Repetición 3	7,08
Repetición 4	7,11
Repetición 5	7,09
Repetición 6	7,12
Repetición 7	7,1
Repetición 8	7,13

CUADRO N°26

pH URINARIO REPETIDO ACUMULADO DE ORINA AL FINALIZAR LAS 6
HORAS DEL CONTROL POSITIVO FUROSEMIDA(10 mg/Kg)

pH Urinario Control Positivo	
Furosemida 10 mg/Kg	pH
Repetición 1	7,52
Repetición 2	7,51
Repetición 3	7,48
Repetición 4	7,47
Repetición 5	7,48
Repetición 6	7,49
Repetición 7	7,5
Repetición 8	7,51

CUADRO N° 27

pH URINARIO REPETIDO ACUMULADO DE ORINA AL FINALIZAR LAS 6
HORAS DEL CONTROL POSITIVO HCT (25 mg/Kg)

pH Urinario Control Positivo	
HCT 25 mg/Kg	pH
Repetición 1	7,36
Repetición 2	7,32
Repetición 3	7,38
Repetición 4	7,38
Repetición 5	7,35
Repetición 6	7,33
Repetición 7	7,36
Repetición 8	7,4

CUADRO N° 28

pH URINARIO REPETIDO ACUMULADO DE ORINA AL FINALIZAR LAS 6 HORAS DE LA DOSIS 1(180 mg/Kg)

pH Urinario Dosis 1	
Dosis 1	
180 mg/Kg	pH
Repetición 1	7,4
Repetición 2	7,42
Repetición 3	7,41
Repetición 4	7,46
Repetición 5	7,43
Repetición 6	7,49
Repetición 7	7,51
Repetición 8	7,46

CUADRO N° 29

pH URINARIO REPETIDO ACUMULADO DE ORINA AL FINALIZAR LAS 6 HORAS DE LA DOSIS 2 (540 mg/Kg)

pH Urinario	
Dosis 2	
540 mg/Kg	pH
Repetición 1	7,58
Repetición 2	7,61
Repetición 3	7,59
Repetición 4	7,6
Repetición 5	7,58
Repetición 6	7,61
Repetición 7	7,62
Repetición 8	7,59

CUADRO N° 30

pH URINARIO REPETIDO ACUMULADO DE ORINA AL FINALIZAR LAS 6 HORAS DE LA DOSIS 3 (900 mg/Kg)

pH Urinario	
Dosis 3	
900 mg/Kg	pH
Repetición 1	7,77
Repetición 2	7,75
Repetición 3	7,8
Repetición 4	7,79
Repetición 5	7,81
Repetición 6	7,78
Repetición 7	7,8
Repetición 8	7,81

CUADRO N° 31
CUANTIFICACIÓN DEL SODIO, POTASIO Y CLORURO URINARIOS DEL
CONTROL NEGATIVO (NaCl 0.9 %)

Control Negativo (NaCl 0.9 %) meq / L			
	Sodio	Potasio	Cloro
Repetición 1	48,01	23,2	78,05
Repetición 2	48,55	22,08	77,75
Repetición 3	49,03	21,78	78,97
Repetición 4	42,37	20,33	76,95
Repetición 5	46	20,8	78,57
Repetición 6	47,86	21	79,03
Repetición 7	47,32	23,03	77
Repetición 8	46,58	22,05	78,1

CUADRO N° 32
CUANTIFICACIÓN DEL SODIO, POTASIO Y CLORURO URINARIOS DEL
CONTROL POSITIVO – FUROSEMIDA (10 mg/Kg)

Control Positivo Furosemida (10 mg/Kg) meq / L			
	Sodio	Potasio	Cloro
Repetición 1	79,03	48,01	93
Repetición 2	78,55	47,07	91,57
Repetición 3	79,33	48,03	90,38
Repetición 4	80	46,97	91,15
Repetición 5	78,43	47,33	92,03
Repetición 6	78,5	48	90,55
Repetición 7	79,35	49,05	92,01
Repetición 8	77,26	47,84	90,67

CUADRO N° 33
CUANTIFICACIÓN DEL SODIO, POTASIO Y CLORURO URINARIOS DEL
CONTROL POSITIVO - HIDROCLOROTIAZIDA (HCT) (25 mg/Kg)

Control Positivo Hidroclorotiazida 25 mg/Kg meq /L			
	Sodio	Potasio	Cloro
Repetición 1	96,01	57,07	104,6
Repetición 2	92,05	60	103,77
Repetición 3	91,06	60,55	105,86
Repetición 4	94,03	61,35	106,77
Repetición 5	95,01	61,78	105,82
Repetición 6	93,77	62,97	106,12
Repetición 7	94,7	60,88	102,01
Repetición 8	93,11	61,5	103,22

CUADRO N° 34
CUANTIFICACIÓN DEL SODIO, POTASIO Y CLORURO URINARIOS DE LA
DOSIS 1(180 mg/Kg)

Dosis 1(180mg/Kg) meq / L			
	Sodio	Potasio	Cloro
Repetición 1	49,8	25,06	77,05
Repetición 2	50,2	23,07	79
Repetición 3	48,6	21,07	80,05
Repetición 4	47,2	23,96	79,07
Repetición 5	49,05	23,02	78,01
Repetición 6	49,07	24,77	79,78
Repetición 7	48,05	26,01	77,96
Repetición 8	46,51	28,07	79,7

CUADRO N° 35
CUANTIFICACIÓN DEL SODIO, POTASIO Y CLORURO URINARIOS DE LA
DOSIS 2 (540 mg/Kg)

	Dosis 2 (540 mg/Kg)		
	meq / L		
	Sodio	Potasio	Cloro
Repetición 1	59,01	39,01	88,7
Repetición 2	58,76	38,75	89,55
Repetición 3	58,1	39,7	88,8
Repetición 4	58,2	36,05	89,78
Repetición 5	59,01	38,01	89
Repetición 6	58,05	33,95	88,07
Repetición 7	60,96	35,07	87,75
Repetición 8	59,06	36,97	90,02

CUADRO N° 36
CUANTIFICACIÓN DEL SODIO, POTASIO Y CLORURO URINARIOS DE LA
DOSIS 3 (900mg/Kg)

	Dosis 3 (900 mg/Kg)		
	meq / L		
	Sodio	Potasio	Cloro
Repetición 1	66,51	48,01	96,34
Repetición 2	69,33	47,77	95,01
Repetición 3	68,53	48,07	97,36
Repetición 4	66,55	46,87	95,02
Repetición 5	69,5	49,01	96,38
Repetición 6	67,02	50,01	99,44
Repetición 7	68,07	47,2	98,26
Repetición 8	69,97	48,12	99,22

CUADRO N° 37
PESO (GRAMOS) DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN LA FASE
INICIAL , INTERMEDIA Y FINAL DEL ESTUDIO TOXICOLÓGICO (DL 50)

		Peso Inicial	Peso al 07	Peso al 14
	Edad	(g.)	día(g.)	día (g.)
Rata Control	2,5 meses	221	224	226
Rata 1A	2,5 meses	220	223	225
Rata 2A	2,5 meses	218	225	227
Rata 3A	2,5 meses	225	231	233
Rata 1B	2,5 meses	230	238	241
Rata 2B	2,5 meses	228	232	238
Rata 3B	2,5 meses	234	237	240

CUADRO N° 38
PROMEDIOS DE LOS PESOS Y VOLUMENES TOTALES INICIALES DE LAS
SUSTANCIAS A ADMINISTRAR PARA LA DETERMINACIÓN DE LA
EXCRECIÓN URINARIA, ACCIÓN DIURÉTICA Y ACTIVIDAD DIURÉTICA
DEL ZUMO DEL *Citrus. limon L.* EN RATAS .

RATAS (n = 8)	PESOS (g) (media)	VOLÚMENES ADMINISTRADOS EN mL POR VIA ORAL (media)
CONTROL NEGATIVO-NaCl 0.9 %	200	5
CONTROL POSITIVO- FUROSEMIDA (10 mg/Kg)	210	5.25
CONTROL POSITIVO-HCT (25 mg/Kg)	200	5
DOSIS 1 (180 mg/Kg)	220	5.5
DOSIS 2 (540 mg/Kg)	215	5.38
DOSIS 3 (900 mg/kg)	205	5.13



Figura N° 24 . FRUTOS DEL LIMÓN



Figura N° 25. OBTENCIÓN DEL ZUMO DEL FRUTO DEL LIMÓN



Figura N° 26 . ZUMO DEL LIMÓN PARA LIOFILIZADO



Figura N° 27 . LIOFILIZADOR VIRTIS



Figura N° 28 . RATAS DE EXPERIMENTACIÓN



Figura N° 29 . DETERMINACIÓN DE LA DIURESIS



Figura N° 30 . DETERMINACIÓN DE LA DL50